



Tânia Wang Liu

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

**Determinação da concentração de Chumbo, e
outros elementos traço, em tecidos dos
peixes-zebra (*Danio rerio*)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor Mauro Guerra, Prof. auxiliar convidado, FCT-UNL
Co-orientador: Professor Doutor Mário Diniz, Prof. Auxiliar, FCT-UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2017

Determinação da concentração de Chumbo, e outros elementos traço, em tecidos dos peixes-zebra (*Danio rerio*)

Copyright © Tânia Wang Liu, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À minha querida avó.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Mauro Guerra, por todo o apoio, incentivo, disponibilidade e rigor, que tornou possível a concretização deste projecto. Obrigada por toda a simpatia, boa disposição e por partilhar ensinamentos desde o primeiro dia. Ao meu co-orientador, o Professor Mário Diniz, por todo o apoio, disponibilidade e dicas fundamentais, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao laboratório de experimentação animal do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente e ao laboratório de Engenharia Biomédica e Física da Radiação (LIBphys), ambos da FCT-UNL, por todo o material necessário para este estudo.

Aos meus colegas de laboratório e docentes, por toda ajuda e compreensão no decorrer deste projecto.

A todos os meus amigos da faculdade, Mariana Cândido, Gonçalo Luís, Gonçalo Costa, Pedro Costa, Paula Martins, Marta Palma e restantes "Alheiras", por estarem presentes nas alturas mais críticas desta aventura. Obrigada por serem mais do que colegas e por terem tornado estes 5 anos fantásticos.

À Sara Pinheiro, Ritinha Rocha Pinto e Maria Pia, por incentivarem e acompanharem na realização desta tese.

À grupeta de Setúbal, por animarem, divertirem e por se terem mostrado uns companheiros inscríveis.

Às minhas amigas de infância, Madalena Cavaco e Inês Almeida e ainda ao Rui Oliveira, por estarem sempre presentes nas alturas necessárias, por todo amor, carinho, paciência e apoio que sempre demonstraram.

E como não podia deixar de ser, um especial agradecimento à minha família, aos meus pais, avós, irmão, tia e Luffy, por todo o apoio, carinho e valores transmitidos, que fazem de mim a pessoa que sou hoje. A todos vós, um sincero obrigado!

"Start where you are.

Use what you have.

Do what you can"

Arthur Ashe

RESUMO

O chumbo é um elemento traço destacado pela sua toxicidade e com impactos negativos para a saúde. Sem função biológica no organismo e devido à sua difícil excreção, a sua bioacumulação é contínua nos seres vivos.

De forma a simular os efeitos do chumbo e compreender a toxicocinética associada ao metal, expôs-se um conjunto de peixes zebra (*Danio rerio*) a diferentes concentrações de chumbo. O peixe zebra é um modelo biológico com ADN totalmente sequenciado e com 71.4% de semelhança ao genoma humano, apresentando inúmeras benefícios ao nível da experimentação animal para estudos em toxicologia.

Expôs-se o *D.rerio* a acetato de chumbo ($Pb(C_2H_3O_3)_2$), com as concentrações de 10mg/L; 20mg/L; 40mg/L e 100mg/L, mantendo-se sempre um grupo de controlo.

As técnicas utilizadas para análise do Pb foram a de EDXRF e ICP-AES devido às vantagens que lhes estão associadas. As duas configurações da fluorescência de raio-x com energia dispersiva escolhidas, μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial, têm como principal interesse o carácter não destrutivo bem como a facilidade de preparação das amostras.

Os resultados obtidos por μ -EDXRF permitem não só a análise multielementar quantitativa como qualitativa e ainda a obtenção da distribuição elementar em órgãos específicos. Posteriormente e com intuito comparativo, recorreu-se ao método com geometria triaxial e ICP-AES, obtendo-se respectivamente as concentrações de chumbo acumuladas nos tecidos do peixe por inteiro.

Através do estudo enzimático, foi possível avaliar o stress oxidativo e os danos provocados pelo chumbo ao nível celular. Utilizaram-se neste estudo as enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, acetilcolinesterase, peroxidação lipídica e ainda as proteínas de stress térmico (HSP70) como biomarcadores de efeito do chumbo.

Palavras-chave: Bioacumulação; Chumbo; *Danio rerio*; μ -EDXRF; EDXRF com geometria triaxial; ICP-AES;

ABSTRACT

Lead is a trace element highlighted by its toxicity and with negative impacts on health. Without biological role in the organism and due to its difficult excretion, its bioaccumulation is continuous in living beings.

To simulate the effects of lead and to understand this metal toxicokinetics, a group of zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to different concentrations of lead. The zebrafish is a biological model with fully sequenced DNA and 71.4% of similarity to the human genome, which offers numerous benefits in animal experimentations for toxicology studies.

D. rerio were exposed to lead acetate $Pb(C_2H_3O_3)_2$, with concentrations of 10mg/L; 20mg/L; 40mg/L, 100mg/L and a control group.

The techniques used to analyse lead include EDXRF and ICP-AE, considering the advantages they present. The two configurations of the chosen *Energy dispersive X-ray fluorescence*, μ -EDXRF and EDXRF with triaxial geometry, present as main interest the non-destructive character as well as the ease of preparing samples.

The results obtained by μ -EDXRF allows not only the quantitative and qualitative multi elemental analysis, but also the elemental distribution on specific organs. Posterior and for comparative purposes, triaxial geometry and ICP-AES methods were used, as to obtain respectively the concentrations of lead accumulation in the entire fish tissues.

Through the enzymatic study, it was possible to assess the oxidative stress and the damages caused by lead at the cellular level. In this study, the enzymes catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, acetylcholinesterase, lipid peroxidation and heat shock proteins (HSP70) were used as lead biomarkers of effect.

Keywords: Bioaccumulation; Lead; *Danio rerio*; μ -EDXRF; EDXRF with triaxial geometry; ICP-AES;

ÍNDICE

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxi
Lista de siglas	xxiii
1 Introdução	1
1.1 Contextualização e estado da arte	1
2 Chumbo e Toxicidade	5
2.1 Chumbo(Pb)	5
2.1.1 Exposição, toxicidade e características do chumbo	5
2.1.2 Interações no Organismo e Biomarcadores	7
2.1.3 Outras interações e Manifestações clínicas nos seres humanos . .	10
2.2 Peixe- zebra (<i>Danio rerio</i>) como modelo vertebrado em estudos de toxicidade	12
2.2.1 Anatomia do peixe-zebra	13
3 Princípios Físicos da Fluorescência de Raios-X	15
3.1 Técnica de Fluorescência de Raio-x (XRF)	15
3.1.1 Raios-X e sua produção	15
3.1.2 Interação da radiação com a matéria	17
3.1.3 Fluorescência de raio-x dispersiva em energia (EDXRF)	19
3.2 ICP-AES	24
4 Materiais e Métodos	25
4.1 Bioensaio de exposição	25
4.2 Preparação das Amostras	26
4.2.1 Análise por μ -EDXRF e EDXRF com geometria Triaxial	26
4.2.2 Análise por ICP-AES	26
4.2.3 Extração de proteínas para Estudo enzimático	27
4.3 Espectrómetros de EDXRF	27
4.3.1 Espectrómetro de μ -EDXRF	27
4.3.2 Espectrómetro de EDXRF com geometria triaxial	28

4.3.3	Processo e método de quantificação	28
4.3.4	Limites de detecção	29
4.3.5	Incertezas associadas	29
4.4	ICP-AES	31
4.5	Biomarcadores	31
4.5.1	Peroxidação Lipídica (LPO)	31
4.5.2	Superóxido Dismutase (SOD)	32
4.5.3	Catalase (CAT)	32
4.5.4	HSP70	32
4.5.5	GPx	32
4.5.6	Acetilcolinesterase (AChE)	32
4.5.7	Análise estatística	32
5	Apresentação, Análise e Discussão de Resultados	35
5.1	Análise qualitativa	35
5.1.1	Distribuição elementar nos tecidos de <i>Danio rerio</i>	35
5.2	Análise quantitativa	36
5.2.1	Análise por μ – EDXRF	37
5.2.2	Análise por EDXRF com geometria triaxial	46
5.2.3	Análise por ICP-AES	46
5.2.4	Comparação de técnicas	48
5.2.5	Análise da água	48
5.2.6	Análise de Biomarcadores	51
6	Conclusão e trabalhos futuros	57
6.1	Conclusão e trabalhos futuros	57
	Bibliografia	59
A	Valores associados às medições efectuadas aos peixe zebra	71
B	Valores associados à técnica de μ-EDXRF	73
C	Valores associados à técnica de EDXRF com geometria triaxial	75
D	Valores associados à técnica de ICP-AES	77
E	Valores associados ao estudo enzimático	79

LISTA DE FIGURAS

2.1	Modelo exposição do chumbo	6
2.2	Esquema do mecanismo de desenvolvimento de stress oxidativo através de exposição ao chumbo	8
2.3	Esquema da inibição de AchE devido a xenobióticos	10
2.4	Mapa dos efeitos neurotóxicos nos humanos	11
2.5	Esquema da anatomia do peixe zebra e identificação em corte	13
2.6	Cortes histológicos e identificação da anatomia dos <i>Danio rerio</i>	14
3.1	Esquema da emissão de raio-x característicos	16
3.2	esquema das transições electrónicas no átomo	16
3.3	Espectro de emissão de raio-x	17
3.4	Efeitos predominantes dos raio-x em função da energia do feixe incidente . .	18
3.5	Esquema da dispersão de compton	19
3.6	Esquema da configuração do μ -EDXRF	21
3.7	Esquema da configuração do policapilar	21
3.8	Esquema da configuração do método de EDXRF com geometria triaxial . . .	22
3.9	Espectro característico de uma amostra através de análise por EDXRF com geometria triaxial	23
4.1	Tanques de bioexposição de <i>Danio rerio</i> ao Pb	26
4.2	Modelo biológico (<i>Danio rerio</i>)	26
4.3	Montagem das amostras para análise em EDXRF	27
5.1	Mapa exemplificativo da distribuição do ferro (laranja) e zinco (rosa) obtido por μ -EDXRF	36
5.2	Mapa exemplificativo da distribuição do cálcio (rosa) e chumbo (encarnado) obtido por μ -EDXRF	36
5.3	Mapa da distribuição multielementar de um peixe exposto a $10\mu\text{g/g}$ obtido por μ -EDXRF	36
5.4	Mapa da distribuição multielementar de um peixe exposto a $100\mu\text{g/g}$ obtido por μ -EDXRF	37
5.5	Figura exemplificativa da selecção dos tecidos alvos a analisar - peixe exposto a $10\mu\text{g/g}$	37

5.6	Gráficos referente às diferentes concentrações de cada órgão obtidas pela técnica de μ -EDXRF para cada grupo de concentração exposto ao Pb	38
5.7	Gráfico da concentração média de Pb nas brânquias para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb	39
5.8	Mapeamento obtido através da técnica de EDXRF de um peixe exposto a $40\mu\text{g/g}$ com corte não simétrico	39
5.9	Gráfico da concentração média de Pb nas vísceras para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb	40
5.10	Gráfico da correlação entre o chumbo e os elementos ferro e cobre	42
5.11	Gráfico da concentração média de Pb no peixe inteiro para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb	42
5.12	Gráfico da concentração média de Pb nas brânquias em função do sexo para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb	44
5.13	Gráfico da concentração média de Pb nas vísceras em função do sexo para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb	45
5.14	Mapa de um <i>Danio rerio</i> exposto a $100\mu\text{g/g}$ com evidência de chumbo na vísceras	45
5.15	Gráfico referente à concentração média de Pb em função do sexo dos <i>Danio rerio</i> obtido através de técnica de EDXRF com geometria triaxial	47
5.16	Gráfico referente à concentração elementar média de Pb em função do sexo dos <i>Danio rerio</i> obtido através de técnica de ICP-AES	47
5.17	Gráfico comparativo das três técnicas utilizadas referentes à concentração elementar média de Pb.	48
5.18	Gráfico comparativo das técnicas de EDXRF utilizadas referentes à concentração elementar média de Pb na zona visceral.	49
5.19	Comparação dos diferentes níveis de peroxidação lipídica causadas pelas diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o <i>Danio rerio</i>	52
5.20	Comparação dos diferentes níveis de inibição de SOD dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o <i>Danio rerio</i>	52
5.21	Comparação dos diferentes níveis de actividade da Catalase dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o <i>Danio rerio</i>	53
5.22	Comparação da quantidade de proteína HSP70 dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o <i>Danio rerio</i>	54
5.23	Comparação dos diferentes níveis de actividade da GPx dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o <i>Danio rerio</i>	55

5.24 Comparação dos diferentes níveis de actividade da AchE dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o <i>Danio rerio</i>	56
--	----

LISTA DE TABELAS

4.1	Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Bush braches e Orchard Leaves com os respectivos valores certificados.	30
5.1	Tabela referente aos factores de bioacumulação das brânquias	40
5.2	Tabela referente aos factores de bioacumulação das vísceras	41
5.3	Tabela referente aos factores de bioacumulação do peixe inteiro	43
5.4	Dados referentes à análise através de ICP-AES da concentração elementar média de Pb da água a que os peixes foram expostos nos bioensaio.	49
5.5	Tabela referente aos factores de bioacumulação corrigidos corrigos	50
A.1	Medições dos peixes zebra.	71
B.1	Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida em função dos tecidos alvos	73
B.2	Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida em função dos tecidos alvos e do sexo dos <i>Danio rerio</i>	73
B.3	Dados referentes à concentração elementar média de ferro e cobre para os diferentes grupos	74
C.1	Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida pela técnica de EDXRF com geometria triaxial	75
C.2	Dados referentes à concentração elementar de Pb obtida em função do sexo dos <i>Danio rerio</i> através da técnica de EDXRF com geometria triaxial	75
D.1	Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida pela técnica ICP-AES	77
D.2	Dados referentes à concentração elementar de Pb obtida em função do sexo dos <i>Danio rerio</i> através da técnica ICP-AES	77
D.3	Dados referentes aos materiais de referência <i>Oyster tissue</i>	78
E.1	Dados referentes aos níveis de peroxidação lipídica para os diferentes grupos	79
E.2	Dados referentes à inibição da SOD. para os diferentes grupos	79
E.3	Dados referentes à actividade da CAT para os diferentes grupos	80

E.4	Dados referentes à HSP70 aquando da exposição ao chumbo dos diferentes grupos	80
E.5	Dados referentes à actividade de GPX para as diferentes grupos de concentração de chumbo	80
E.6	Dados referentes à actividade de AchE para as diferentes grupos de concentração de chumbo	80

LISTA DE SIGLAS

AchE	Acetilcolinesterase.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
BDL	Abaixo do Limite de Detecção (<i>Below Detection Limit</i>).
CAT	Catalase.
DCEA	Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente.
EDXRF	<i>Energy dispersive X-ray fluorescence</i> (fluorescência de Raios-X dispersiva em energia).
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay".
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.
GPx	Glutathione peroxidase.
GSH	Glutathione.
GSSG	dissulfeto de glutathione.
GST	Glutathione S-transferase.
High Voltage	HV Alta Tensão.
HSP70	<i>Heat shock proteins</i> (proteínas de stress térmico).
ICP-AES	Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido.

LISTA DE SIGLAS

K	Camada electrónica com número quântico principal(1).
L	Camada electrónica com número quântico principal(2).
LC50	Concentração letal.
M	Camada electrónica com número quântico principal (3).
MDA	Malondialdeído.
μ -EDXRF	<i>micro-Energy dispersive X-ray fluorescence</i> (micro fluorescência de Raios-X dispersiva em energia).
K_{α}	Riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X.
K_{β}	Segundas riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X.
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina.
OECD Zebrafish	Normas zebrafish estabelecidas pela <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organização de desenvolvimento e co-operação económica).
OMS	Organização mundial de Saúde.
ROS	espécies reactivas do oxigénio.
SOD	Superóxido Dismutase.
SRM	<i>Standard Reference Material</i> (Material de referência).
TBA	Ácido tiobarbitúrico.
TXRF	Fluorescência de Raios-X de reflexão total.

XRF *X-ray fluorescence* (Fluorescência de raio-x).

Z número atômico.

INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização e estado da arte

O Chumbo é um elemento extremamente tóxico e é considerado como 1 dos 10 maiores problemas de saúde pública pela Organização mundial de Saúde (OMS). Embora seja utilizado há muitos séculos pelas diferentes indústrias, entre as quais a produção de tintas, plásticos, vidros e cerâmicas, os efeitos nocivos do chumbo só foram identificados nas últimas décadas. Desde então, tem existido uma crescente preocupação na erradicação da exposição ao Pb que resultou na retirada de alguns produtos do mercado como brinquedos, tintas e aditivos da gasolina.

Devido à sua presença em diversos objetos e produtos, a contaminação e exposição a este metal é contínua e problemática. Por essa razão e devido à necessidade de compreender a toxicocinética do chumbo num organismo vivo, o estudo relacionado com este metal é de enorme importância [1]. A compreensão da sua acumulação e distribuição em tecidos alvo e sua toxicocinética podem auxiliar no tratamento de intoxicações que podem levar a patologias como a anemia, osteoporose e problemas neurológicos severos [2]. Devido ao seu carácter tóxico e a impossibilidade de testar em humanos, os ensaios de exposição são usualmente realizados em modelos animais de vertebrados (ex: ratinho, rato, peixes) [3].

Os peixes-zebra (*D. rerio*) têm bases biológicas e genoma similar ao humano, oferecendo inúmeras vantagens experimentais como a dispensa de homologação de ensaios biológicos por comissões de ética de experimentação animal, possibilitando a aproximação ao modelo humano [4].

No presente estudo expõe-se o peixe-zebra (*Danio rerio*) a água contaminada com chumbo. Os ensaios de exposição foram realizados na sala de experimentação animal do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente (DCEA) da Faculdade de Ciências

e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL) e têm como objectivo a análise da distribuição elementar de Pb, e outros elementos traço, assim como a respectiva quantificação nos diferentes tecidos alvo do peixe.

Nos últimos anos, tem sido explorado o desenvolvimento de métodos analíticos inovadores para a detecção química direta nas amostras biológicas, reportado por Wu *et al.* [5]. Entre elas, destaca-se a técnica de *Energy dispersive X-ray fluorescence* (fluorescência de Raios-X dispersiva em energia) (EDXRF), que permitem a detecção multielementar rápida, eficiente e não sendo usualmente necessária preparação e/ou destruição de amostras. Em conjunto com a Espectroscopia de emissão atómica por plasma induzido (ICP-AES), são as técnicas escolhidas para a análise das amostras deste estudo. Por apresentar melhores limites de detecção do que a EDXRF, a técnica de ICP-AES permite confirmar os valores obtidos pela primeira técnica bem como detectar outros elementos que passem despercebidos em EDXRF[6]. Mais informações acerca das suas vantagens podem ser encontradas no artigo de revisão efetuado por West *et al.* e nas referências do mesmo [7].

Magalhães *et al.*[8] confirmaram os valores obtidos pela técnica de EDXRF, através da técnica de Fluorescência de Raios-X de reflexão total (TXRF). Analisaram variados elementos como o Be, Cr, Co, Fe, Ni, Cu e Pb em tecidos humanos saudáveis/cancerígenos e obtiveram uma gama de valores consistentes entre as duas técnicas. Concluíram que existia deposição de diferentes concentrações de elementos nos diferentes tecidos malignos e que metais como o Pb, Cr, Hg Cd apresentavam propriedades cancerígenas. Também Guimarães *et al.*[9] recorreram à análise de EDXRF para evidenciar a acumulação do chumbo no cérebro. Mantiveram um grupo de controlo e utilizaram um protocolo baseado em estudos prévios. Após sacrificarem os animais, analisaram os cérebros por EDXRF e compararam os resultados. Recorreram ainda a outros métodos como a espectroscopia de absorção atómica com atomização electrotérmica (ETAAS) e microscópio ótico, como complementariedade ao estudo. Apesar dos resultados obtidos através de EDXRF não apresentarem diferenças significativas, a análise por ETAAS e biomarcadores mostrou alterações associadas a doenças nos ratos.

Bilo *et al.* [10] recorreram à *X-ray fluorescence* (Fluorescência de raio-x) (XRF) para estudar a acumulação de Pb e Zn em embriões de peixe-zebra, registando uma progressiva acumulação dos metais proporcional à concentração administrada .

Por outro lado, Custódio *et al.*[11] utilizaram a EDXRF com geometria triaxial para determinar elementos traço como o K, Ca, Fe e Pb em tecidos humanos, comprovando a técnica através de valores certificados .

Através da técnica de ICP-AES, Ayed *et al.*[12] estudaram diferentes elementos de peixes *Atherina lagunae* e apesar de o chumbo se apresentar abaixo do limite de detecção, serviu de indicador ambiental para a região em questão [12].

Takamiya *et al.* [13] investigaram o efeito da acumulação de diferentes elementos traços, entre elas o chumbo, no tecido cristalino do olho dos embriões *Danio rerio*. As amostras dos embriões foram examinadas através de *micro-Energy dispersive X-ray fluorescence* (micro fluorescência de Raios-X dispersiva em energia) (μ -EDXRF) de acordo com

protocolos padrão. Constataram que os diferentes elementos se acumularam de formas diferentes, sendo o chumbo pouco detectado nos diferentes tecidos oculares. Foi ainda realizado um estudo enzimático para análise do stress oxidativo, através de biomarcadores como a catalase e glutathione peroxidase.

Os biomarcadores indicam-nos acerca dos danos a nível celular dos efeitos dos xenobióticos e são assim utilizados para avaliar os efeitos do chumbo no peixe-zebra [14].

Rehman *et al.*[15] realizaram um estudo enzimático de forma a verificar os efeitos produzidos pela exposição ao chumbo. Entre eles, utilizaram a peroxidação lipídica e observaram aumentos muito significativos em carpas. Também Farombi *et al.*[16] utilizaram os biomarcadores de stress oxidativo e os níveis de metais pesados como indicadores de poluição ambiental. Expuseram peixes gato a inúmeras substâncias e para uma concentração de 0,29 $\mu\text{g/g}$ compreenderam que induzia significativamente o stress oxidativo e causava danos celulares.

Tanto quanto sabemos, nenhum estudo da distribuição elementar global nos diversos órgãos dos peixes foi efetuado até ao momento, tendo apenas sido publicados trabalhos focando-se apenas em um ou pequenos grupos de órgãos simultaneamente. Assim, pretende-se estudar não só as interações do chumbo com os diversos tecidos biológicos, mas também o desenvolvimento de um modelo toxicocinético que permita uma analogia com o ser humano e permitir inovações no campo da saúde.

CHUMBO E TOXICIDADE

2.1 Chumbo(Pb)

O chumbo é um dos contaminantes ambientais mais comuns, com elevada toxicidade para os homens e animais e sem qualquer função fisiológica nos organismos. [17]. Naturalmente no ambiente, estima-se que a sua concentração na crosta terrestre seja aproximadamente de $1,4 \times 10^1$ mg/kg e à volta de $3,0 \times 10^1$ mg/kg nos oceanos [18].

O chumbo é um dos metais mais utilizados nas diferentes indústrias, como a metalúrgica, metalomecânica, químicas e gasoleiras (até ser proibido o seu uso), devido, sobretudo, à sua resistividade[19]. No entanto, devido ao seu uso ao longo dos séculos, este metal é caracterizado pela sua toxicidade e considerado como um dos mais perigosos poluentes ambientais que afetam os sistemas biológicos[20]. Em doses elevadas tem efeitos tóxicos em vários órgãos, particularmente no sistema nervoso devido à sua sensibilidade ao metal [21]. Uma vez presente no organismo, a sua excreção é muito difícil, acumulando-se em órgãos como os ossos, os rins, fígado, entre outros [22].

2.1.1 Exposição, toxicidade e características do chumbo

O chumbo é um elemento com símbolo químico Pb, número atómico 82 e energias de ligação de 74.96 KeV para a camada K, 10.55 KeV para a camada L e 2.35 KeV para a camada M[23]. O chumbo pode ser encontrado no ambiente na forma elementar, em compostos inorgânicos e orgânicos de Pb. Devido à sua configuração electrónica e camadas de valência $6s^2 6p^2$ com 4 electrões de valência, o chumbo ioniza facilmente, pelo que a sua existência na forma elementar é pouco comum [24]. O chumbo inorgânico é formado por sais e óxidos de chumbo e apresenta-se habitualmente na forma Pb^{2+} . Por outro lado, os compostos orgânicos do chumbo estão predominantemente na forma Pb^{4+} e incluem o chumbo tetraetila e tetrametilina[2]. Relativamente à sua solubilidade, este metal pode

ser solúvel ou insolúvel em água, sendo exemplos dos primeiros os acetatos, nitratos e cloretos e exemplo dos outros os arsenatos, brometos e fosfatos.

O Pb orgânico aparenta ser mais tóxico que o Pb inorgânico uma vez que é lipossolúvel e o organismo tem maior facilidade em absorvê-lo, entrando assim na circulação sanguínea [25]. Em contrapartida, apesar da absorção direta da forma inorgânica ser baixa (apenas 20% da quantidade total da exposição), a maioria do chumbo orgânico absorvido é convertido em chumbo inorgânico, pelo que esta é a forma responsável pela maioria dos efeitos nocivos nos seres vivos[22]. A fracção de chumbo orgânico remanescente não costuma interagir com os organismos [1]. Uma vez na corrente sanguínea, este composto distribui-se através do plasma e sangue para os diferentes tecidos.

As principais vias de exposição ao Pb na espécie humana ocorrem principalmente através da ingestão, inalação ou da absorção, e as principais fontes de contaminação são os alimentos, a água e o ar, como ilustrado pela figura 2.1.

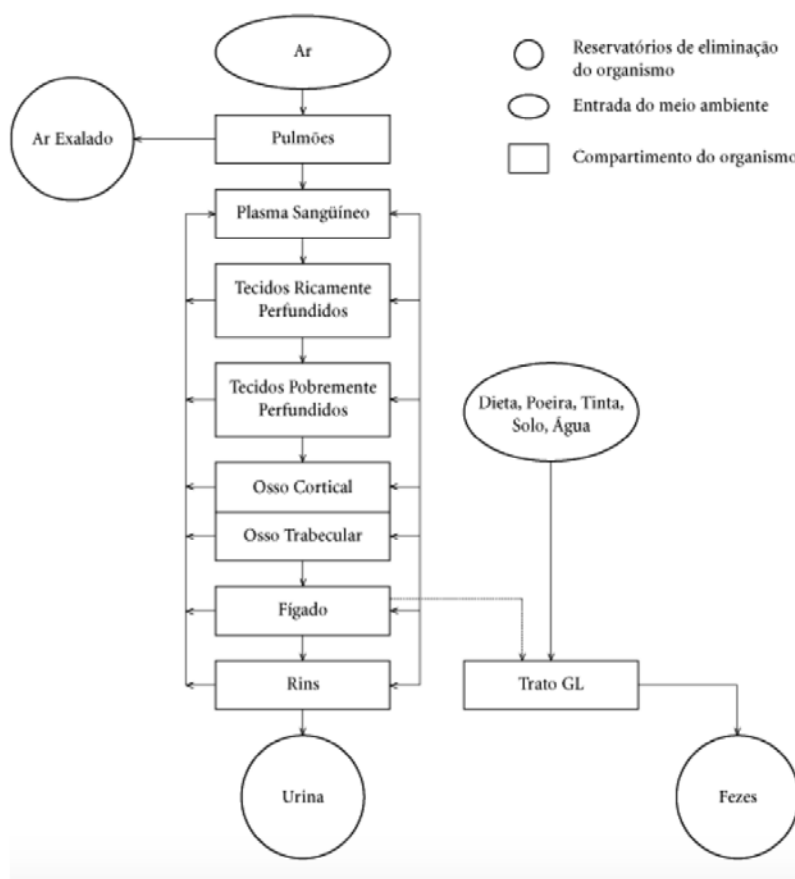


Figura 2.1: Modelo exposição ao chumbo [17]

Como consequência da revolução industrial e devido à sua elevada procura, a produção e utilização deste metal aumentou, levando também a um aumento da sua concentração nos materiais utilizados no dia-a-dia das populações[2]. A libertação de Pb na

atmosfera foi, assim, inevitável, entrando nos ciclos de distribuição de água e contaminando solos e ambientes aquíferos. Como consequência deste ciclo, o chumbo passou a fazer parte da cadeia alimentar dos seres vivos, provocando bioacumulação ao longo da cadeia alimentar e assim efeitos adversos na saúde humana [26]. Em 1997 estimou-se que fossem introduzidas diariamente no corpo humano, 300 a 460 μg de Pb, contribuindo para uma bioacumulação constante e contínua [27]. Devido à grande exposição ao chumbo e por se revelar um problema eminente, foram retirados inúmeros produtos que continham este metal, como a gasolina com chumbo em 2000.

2.1.2 Interações no Organismo e Biomarcadores

A absorção do chumbo no organismo humano e de outros animais é altamente influenciada por fatores endógenos como a idade, alimentação, dimensão de partículas, duração, dose e frequência de exposição [1, 28].

A intoxicação por Pb pode ser aguda, com duração inferior a 24 horas, por uma ou múltiplas exposições, ou crónica (assim classificada para valores superiores a 30 $\mu\text{g}/\text{dia}$), com período superior a 3 meses e através de várias doses cumulativas [2]. No entanto, a intoxicação aguda não é frequente, uma vez que o chumbo é pouco solúvel, pelo que não se acumula em grandes quantidades de forma imediata nos tecidos dos animais [22].

Após exposição, o chumbo difunde-se através do sangue para os diferentes tecidos moles e mineralizados e os seus efeitos vão depender da sua afinidade para com as diferentes moléculas[29].

A toxicidade deste elemento advém predominantemente da sua particularidade de inibir diversas enzimas e interagir com outros metais e compostos celulares. Como tem alta afinidade com ligantes como o enxofre, o azoto ou o oxigénio tem como repercussão a interferência a nível biológico [2, 30]. O maior efeito tóxico do chumbo a nível celular é o aumento das espécies reactivas do oxigénio (ROS), causando stress oxidativo [31].

Em condições normais, a concentração de ROS é mantida pela atividade enzimática dos antioxidantes, que em baixas concentrações são benéficas para as células e estão envolvidas nos processos de regulação e sinalização[32]. Em situações de contato com agentes xenobióticos, como é o caso do chumbo, a produção de ROS face aos antioxidantes aumenta bastante, gerando-se radicais livres que danificam as estruturas celulares e os tecidos (ver figura 2.2). Actuam através da modificação, alteração e inativação dos diferentes lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, alterando as suas funções normais e podendo até levar à morte celular. O desequilíbrio referido anteriormente também pode ocorrer através da inibição de antioxidantes [31, 33].

Os antioxidantes são mecanismos de defesa biológica contra os radicais livres, ligando-se e neutralizando-os. Distribuem-se em grande número por todos os tecidos do organismo, e são exemplo disso a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutati-ona (GSH), que transformam os radicais livres noutros compostos facilmente excretáveis e inócuos para as células. As interações e metabolismos resultantes destas enzimas podem

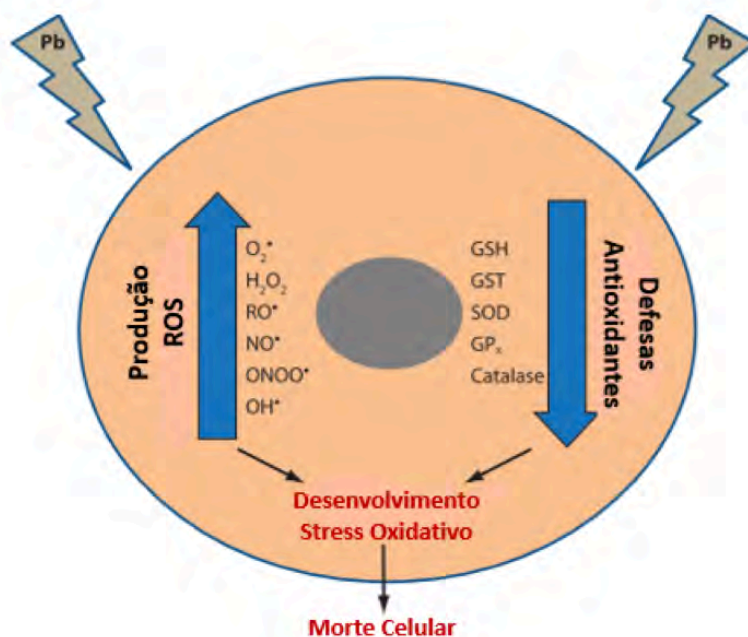


Figura 2.2: Esquema do mecanismo de desenvolvimento de stress oxidativo através de exposição ao chumbo[31]

ainda ser utilizados como sinalizadores específicos e biomarcadores de efeito deste metal nos tecidos [29, 34, 35].

Estes biomarcadores têm maior expressão no fígado, órgão na qual ocorre absorção de agentes xenobióticos e transformação enzimática de ROS [29, 36].

2.1.2.1 Peroxidação Lipídica (LPO)

A entrada do chumbo nos organismos induz a peroxidação lipídica, removendo os elétrons, oxidando e degradando os lipídios [37] [32]. As espécies reativas de oxigênio atacam as ligações duplas de carbono dos ácidos gordos da membrana lipídica, destruindo-a e afetando assim a viabilidade da célula. A peroxidação lipídica tem como produto o Malondialdeído (MDA), revelando-se assim como um excelente biomarcador de danos nas membranas celulares [38].

2.1.2.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase, SOD, tem um papel fundamental no que toca à desintoxicação de xenobióticos. Esta enzima catalisa a dismutação do superóxido, 2 radicais superóxidos, em peróxido de hidrogênio como representa a equação 2.1 [39],



O superóxido, uma ROS, provoca danos nas células ao nível do Ácido desoxiribonucleico (ADN), moléculas e proteínas. Como defesa, a maioria das células sintetiza a SOD de forma a neutralizar os efeitos nocivos do superóxido[40]

2.1.2.3 Catalase (CAT)

A CAT participa no processo de neutralização do peróxido de hidrogénio, catalisando 2 moléculas de H_2O_2 em oxigénio molecular, como vemos na equação 2.2: [41]



Devido ao seu carácter tóxico para as células, o peróxido deve ser convertido rapidamente noutro produto [42]. O peróxido de hidrogénio é um produto decorrente do metabolismo celular e também um dos produtos da acção da SOD. Em cadeia com a última enzima referida, a CAT actua também como uma das primeiras defesas contra o stress oxidativo e tem um papel fundamental na desintoxicação de xenobióticos[43].

2.1.2.4 HSP70

Outro dos efeitos causado pela entrada do chumbo nas células é o aumento da expressão de várias proteínas de stress [44]. As *Heat shock proteins* (proteínas de stress térmico) (HSP70), ligam-se a proteínas danificadas pelo chumbo e promovem a sua degradação. Estas proteínas são chaperones moleculares e são muito importantes para o processo de *folding* (enovelamento) das proteínas. Actuam ao nível do transporte e regulação da atividade proteica através da sua interacção com segmentos peptídicos hidrofóbicos e em contato com as proteínas afectadas, previnem a sua agregação e degradação através de proteossomos ou lisossomas [45].

2.1.2.5 Glutathione Peroxidase (GPx)

A glutathione peroxidase tem como função a remoção e inactivação do hidrogénio e da peroxidação lipídica, protegendo contra o stress oxidativo [43].

A glutathione peroxidase é uma enzima que tem como papel catalisar a redução do peróxido de hidrogénio ou hidropoxidases, utilizando a GSH como dador de electrões. Durante a reacção, a GSH é oxidada e transformada em dissulfeto de glutathione (GSSG), protegendo assim contra o stress oxidativo[46]

2.1.2.6 Acetilcolinesterase (AChE)

A Acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que participa na degradação da acetilcolina, responsável pelas sinapses químicas [47]. Após o estímulo, existe libertação de acetilcolina na fenda sináptica, devido à abertura dos canais de Ca^{2+} , que promovem a fusão das vesículas com a membrana. Através da acção da AChE, a acetilcolina é degradada em colina

e acetato e posteriormente armazenada em vesículas, garantindo o normal funcionamento das transmissões neuronais [48].

Na presença de chumbo e de outros metais, estes ligam-se à AchE e formam um complexo altamente estável e irreversível, inibindo e inativando a enzima [49, 50]. A diminuição da AchE disponível para degradação da acetilcolina, resulta num decréscimo do potencial pós-sináptico, acumulação de Acetilcolina e interrupção da neurotransmissão com consequências neurológicas, como ilustrado na figura 2.3[51, 52]. A utilização deste biomarcador tem particular interesse neste estudo, uma vez que é a única enzima produzida pelo *Danio rerio* responsável pela regulação sináptica [53].

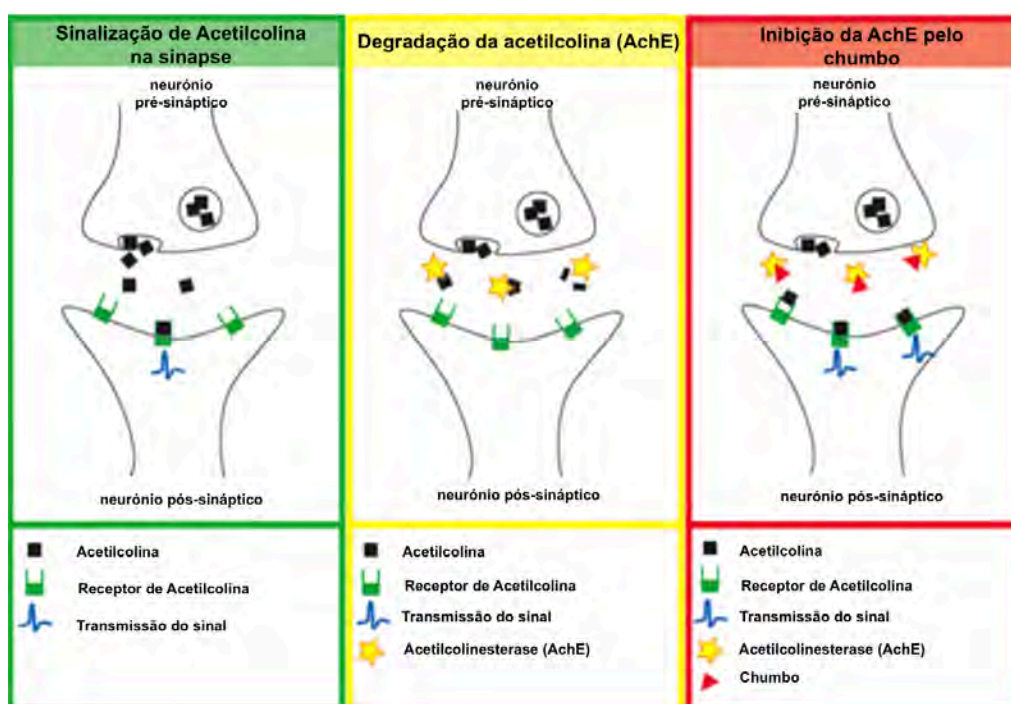


Figura 2.3: Esquema da inibição de AchE devido a xenobióticos (adaptado de[54])

2.1.3 Outras interações e Manifestações clínicas nos seres humanos

Nos seres humanos, as manifestações clínicas provocadas pelo chumbo incluem fraqueza, náuseas, irritabilidade, anemia, dores abdominais e afectam os diferentes órgãos e tecidos. Têm surgido ainda diversos estudos no sentido de provar a associação do chumbo com o desenvolvimento do cancro. [28].

O sistema circulatório é um órgão crítico para a toxicidade e apesar de ser pouco afetado pelas doses de chumbo, é responsável pela irrigação e transporte do metal a todos os outros órgãos. A inibição da ferroquelatase, responsável pela heme sintase, é uma das consequências directas do efeito do Pb nos eritrócitos. Estes apresentam deficiências ao nível da ligação com o ferro, causando anemia e palidez[2]. O chumbo modifica ainda a função de ativação do cálcio das células musculares.

O sistema nervoso é o principal alvo da toxicidade do chumbo, que desencadeia a diminuição da velocidade de condução dos nervos e enfraquecimentos das estruturas musculares nervosas. O cérebro pode ser afetado através da substituição do cálcio, estimulação da proteína Quinase C(PKC) e inibição do glutamato, que causam alterações na barreira hematoencefálica e nos neurotransmissores, essenciais para o seu normal funcionamento, figura 2.4.

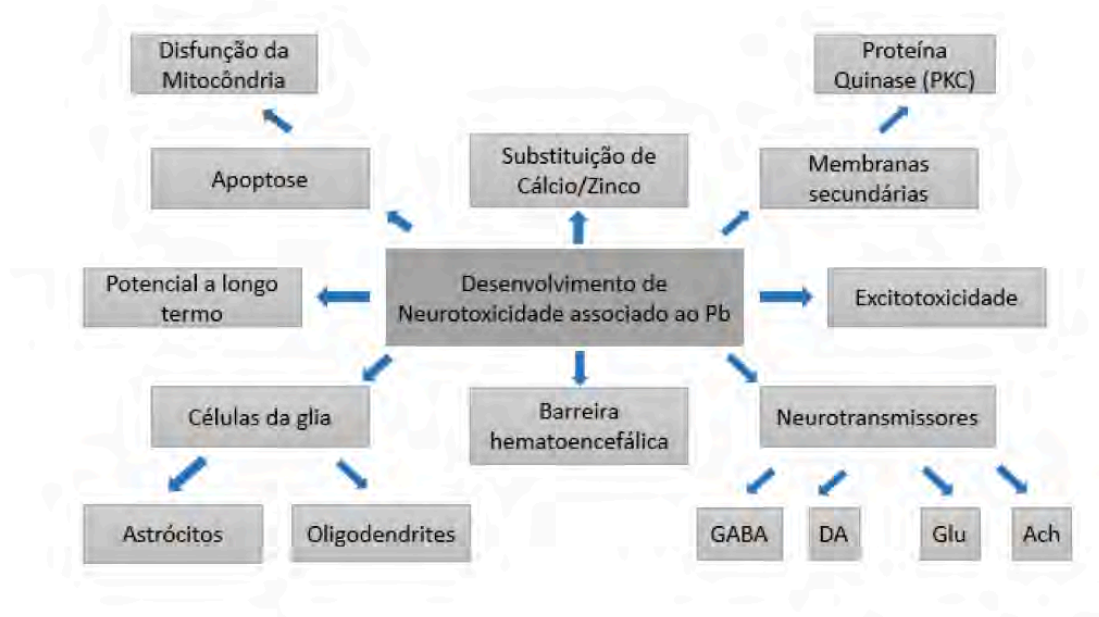


Figura 2.4: Mapa dos efeitos neurotóxicos nos humanos (adaptado de [55])

O principal local de armazenamento do Pb (cerca de 95%) é o osso, sendo que os restantes 5% estão maioritariamente distribuídos pelos tecidos do fígado, rins e cérebro [17]. Os ossos e os dentes são estruturas altamente ricas em cálcio. Quando em contato com o chumbo, os mecanismos homeostáticos e metabólicos destes tecidos são afetados pelos da competição e substituição do cálcio pelo metal, comprometendo a robustez e resistência destas estruturas. O tempo de meia-vida nos ossos é de, aproximadamente, 25 anos, o que leva a uma bioacumulação lenta e gradual. Consequentemente, devido à quantidade que vão acumulando, os ossos funcionam como reservatórios que vão libertando o metal sucessivamente ao longo da vida do paciente[2].

Uma vez acumulado, a excreção de Pb é muito demorada e ocorre principalmente por vias urinárias, fecais e através da respiração, suor e saliva, mesmo que em quantidades muito menores [17].

Atendendo às inúmeras complicações e efeitos causados pela exposição ao Pb, este é considerado um metal extremamente nocivo para a saúde pública, sendo alvo de estudo por vários grupos de investigação espalhados por todo o mundo [20]. No entanto, devido aos motivos referidos anteriormente, o seu estudo experimental controlado em humanos é inviável, pelo que se tem recorrido a modelos animais (ratinho, rato, peixes) e cujos

resultados possam ser de algum modo extrapoláveis para a espécie humana [56].

2.2 Peixe- zebra (*Danio rerio*) como modelo vertebrado em estudos de toxicidade

O *Danio rerio*, comumente denominado de peixe-zebra, habita num ambiente de água doce ligeiramente alcalino de pH 8.0, a temperaturas que oscilam entre 20°-30°C. São animais extremamente resistente às variações de temperaturas (de 6° a 38°C) e, por isso, conseguem sobreviver em quase todas as localidades geográficas [57, 58].

Os peixes zebras têm sido amplamente utilizados como modelo de vertebrados, principalmente em diversos estudos de biologia e biomedicina. Devidas às suas características e ao “zebrafish genome Project”, que permitiu decodificar todo o seu ADN, estes têm sido organismos modelo em estudos de toxicologia. As bases moleculares da neurobiologia e genoma similar ao humano (71.4%), denunciam o seu valor no mundo da investigação e ciência[59]. O recurso a esta espécie tem sido crescente, fornecendo informações relevantes nas áreas da toxicologia química, no estudo dos efeitos das drogas de abuso e ainda das doenças humanas [3].

As características morfológicas e fisiológicas deste peixe facilitam os ensaios laboratoriais. O seu tamanho pode variar entre 2 a 4 cm e reduz o espaço necessário para a sua manutenção, permite utilizar materiais de pequenas dimensões (caixas petri, lâminas) e baixas quantidades de dosagem dos químicos a testar, resultando num custo mais reduzido da realização dos respectivos ensaios [3, 60].

Para além do seu tamanho, os *Danio rerio* apresentam rápida maturação, por volta dos 3 a 6 meses, e alta fecundidade, com capacidade para originar 200-300 ovos num dia e possibilitando uma replicação alta e inúmeros alvos de estudo. Após fecundados, os embriões são permeáveis a pequenas moléculas, facilitando a uma administração de agentes tóxicos [57].

No início da sua fase adulta, o peixe zebra é transparente, permitindo obter informações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e, ainda, informações acerca dos diversos efeitos provocados pela exposição a um dado composto químico, sendo esta uma grande vantagem quando comparado com outros peixes.

A utilização deste modelo ao longo de várias décadas de estudos possibilitou um conhecimento aprofundado das condições óptimas de manutenção desta espécie, aumentando a probabilidade da criação de cenários de estudo de longa e curta duração [3].

A escolha do peixe zebra em detrimento de mamíferos roedores em laboratório facilita a aprovação pelas autoridades competentes e simplifica a adopção de protocolos de experimentação animal, sendo esta uma das principais razões do recurso a estes modelos [61]. Os procedimentos laboratoriais devem seguir as normas para peixe zebra estabelecidas pela Normas zebrafish estabelecidas pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização de desenvolvimento e co-operação económica) (OECD Zebrafish)

e permitem assim a uniformização e comparação dos resultados [62].

2.2.1 Anatomia do peixe-zebra

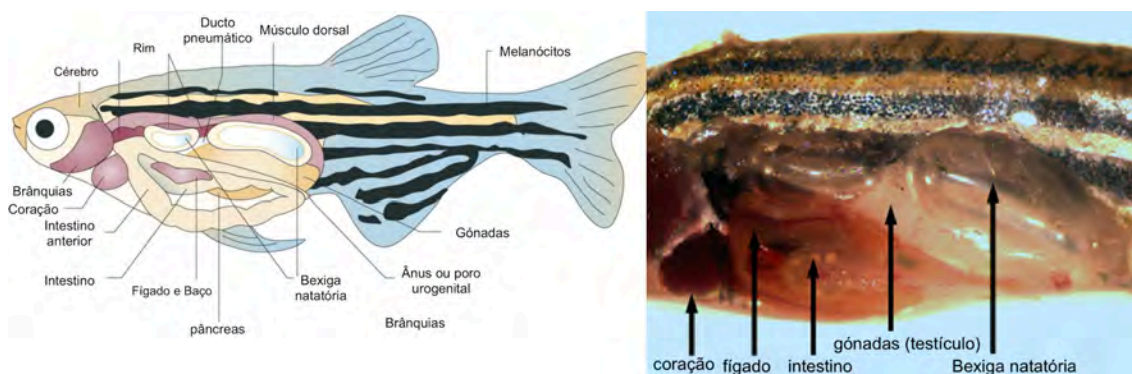


Figura 2.5: Esquema da anatomia do peixe zebra (adaptado de [63]) e identificação em corte (adaptado de [64])

O *Danio rerio* possui um corpo fusiforme, comprimido lateralmente com comprimento médio de 25mm, e exibe um elevado grau de semelhança a nível anatômico e fisiológico com o mamífero [57]. Analogamente, possui também os tecidos e órgãos como o coração, cérebro, fígado, pâncreas, rim, intestino, tiróide, brânquias, ossos, músculos, bexiga natatória, olhos, sistema nervoso, órgãos sensoriais e ainda um sistema imunitário de defesa, como mostra a figura 2.5. As suas características funcionais são muito parecidas às dos mamíferos, apresentado um sistema circulatório, composto por eritrócitos e trombócitos, responsável pela distribuição e fornecimento de oxigênio a todo o corpo. Situado anteriormente à cavidade principal e apesar da sua estrutura ligeiramente diferente dos mamíferos (apenas 1 aurículo e 1 ventrículo), o coração bombeia todo o sangue para os locais necessários e é regulado através de um sistema elétrico [4].

A oxigenação do sangue é assegurada pelas brânquias e pelo opérculo. A água entra maioritariamente através da boca, passa pelas brânquias e sai através do opérculo, garantindo deste modo, as trocas gasosas. As brânquias são estruturas ósseas que se situam junto ao coração, na cavidade anterior.

O peixe zebra possui também um sistema gastrointestinal e fazem parte dele órgãos como os intestinos, fígado, vesícula biliar, bexiga natatória, e pâncreas. Este sistema tem como principal objetivo a excreção de substâncias não digeridas, mas também apresenta um papel fundamental na eliminação de agentes xenobióticos. O sistema imunitário de defesa dos peixes-zebra é assegurado através da produção de leucócitos e linfócitos, maturados no timo. Em conjunto com o timo e o rim, os agentes xenóbitos são removidos.

Relativamente ao sistema reprodutivo, dependendo de se o peixe é macho ou fêmea, apresenta testículos ou ovários, como apresentado na figura 2.6.

Tal como o ser humano, apresenta também o sistema sensorial, nervoso e cérebro, responsável pelo olfato, memória e comportamentos. O hipotálamo-hipófise regulam as



Figura 2.6: Cortes histológicos e identificação da anatomia de *Danio rerio* (adaptados de [65])

hormonas, neurotransmissores e ritmo cardíaco da espécie. Apesar de todas as semelhanças com os mamíferos a nível anatómico e funcional, os *Danio rerio* não possuem órgãos como pulmões, próstata, estômago (que é substituído pelo intestino), pele (mas sim escamas) e glândulas mamárias. Apresentam ainda algumas alterações estruturais nos tecidos dos rins. [66]

PRINCÍPIOS FÍSICOS DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

3.1 Técnica de Fluorescência de Raio-x (XRF)

A técnica de fluorescência de raio-x é um método analítico que determina as composições químicas dos diferentes materiais. A fluorescência de raio-x pode ser incorporada em vários sistemas, entre elas a Energy Dispersive-XRF (EDXRF). A fluorescência de raio-x dispersiva em energia é a técnica utilizada neste trabalho, mais concretamente, o μ -EDXRF e o EDXRF com geometria triaxial, pelo que será descrita mais detalhadamente mais a frente [67, 68]. Este método analítico utiliza os raios-x e respectivos processos de ionização que originam espectros característicos e informação quantitativa e qualitativa das amostras utilizadas[68]. De forma a compreender a técnica e respectivo funcionamento é necessário perceber os conceitos de raios-X e processos físicos inerentes, que se apresentam de seguida.

3.1.1 Raios-X e sua produção

Os raios-x são radiação eletromagnética, com comprimentos de onda que variam entre 0.005 nm até 10 nm e energias entre 0.125 e 125 keV [67, 68]. Os raios-x foram descobertos acidentalmente em 1895 por Roentgen e têm sido, desde então, amplamente utilizados [69].

Os raios-X tipicamente são produzidos quando partículas de alta energia atingem um alvo. Este fenómeno pode acontecer através de três mecanismos: 1) desaceleração de partículas carregadas, como electrões, prótons, partículas alfas e iões; ou 2) transições electrónicas das camadas internas dos átomos após a sua ionização ou excitação, e ainda 3) transições radiativas entre estados excitados nucleares. O primeiro mecanismo resulta

na emissão da denominada radiação de travagem, vulgarmente conhecida como *bremsstrahlung*, que é produzida devida à desaceleração de Coulomb das partículas de alta energia, e que resulta num espectro contínuo de radiação.

O segundo mecanismo ocorre devido à interação entre uma partícula incidente ou um fóton e um electrão ligado de um átomo. Caso a energia seja suficiente para remover o electrão da orbital, ocorre a excitação ou a ionização do átomo. Isto cria uma lacuna na estrutura electrónica, que pode ser preenchida por um electrão das camadas electrónicas mais externas [6, 67, 70]. Ao retornar ao seu estado fundamental, é emitido um fóton de raio-x, com energias correspondentes à diferença entre a energia das camadas eletrónicas envolvidas na transição, ou, em certos casos, é emitido um electrão Auger em vez do fóton, que é mais provável para elementos mais leves. O terceiro mecanismo ocorre essencialmente em materiais radioactivos e normalmente a radiação emitida por estes, ainda que podendo ter energias na gama dos raios-X, é conhecida como raios- γ . O rendimento de fluorescência é dado pela razão entre o processo referido anteriormente e o número de átomos ionizados, dando-nos a probabilidade de ocorrência dos raios-x [67, 71].

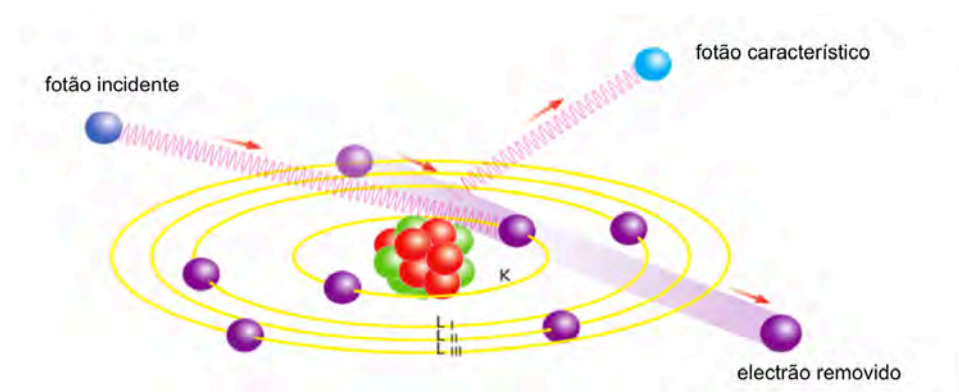


Figura 3.1: Esquema da emissão de raio-x característicos (adaptado de [68])

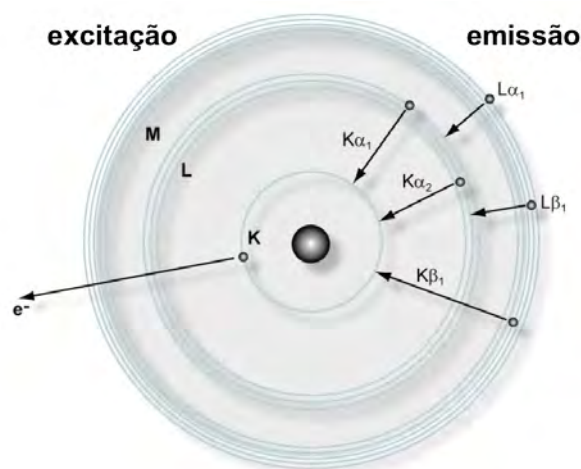


Figura 3.2: esquema das transições electrónicas no átomo (adaptado de [71])

A emissão de raios-X característicos, denominada de fluorescência, apresenta energias bem definidas para cada elemento e dizem respeito à Camada electrónica com número quântico principal(1) (K), Camada electrónica com número quântico principal(2) (L) e Camada electrónica com número quântico principal (3) (M) da estrutura dos átomos, representado pela figura 3.1. De um modo simplificado, quando um electrão da camada L preenche uma lacuna na camada K, ocorre uma emissão de raio-x específica do elemento, de Riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X (K_{α}). Mas se a lacuna for preenchida por um electrão da camada M, ocorre então emissão de uma linha das Segundas riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X (K_{β}) (figura 3.2). Este processo permite assim a detecção dos correspondentes elementos e é conseguida graças à estrutura electrónica característica dos mesmos, apresentando-se sob a forma de riscas espectrais [72].

O espectro de emissão de raio-x é assim obtido pela combinação dos dois mecanismos referidos, com componente contínua e componente da radiação característica, como mostra a figura 3.3.

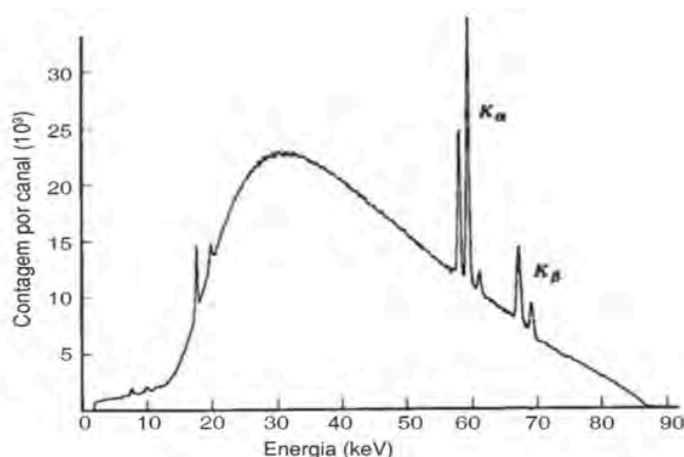


Figura 3.3: Espectro de emissão de raio-x (adaptado de [73])

3.1.2 Interação da radiação com a matéria

A interação da radiação eletromagnética com a matéria vai depender tanto da energia do feixe incidente como dos átomos que constituem a matéria. As principais interações na gama de energias de trabalho são o efeito fotoelétrico, dispersão de Rayleigh e dispersão de Compton. Ao incidir na matéria, o raio-x vai ser transmitido, absorvido e disperso elástica ou inelasticamente [69]. Tanto a absorção como a dispersão contribuem para a atenuação do feixe de raio-x, descrita pela lei de Lambert-Beer, equação 3.1:

$$I = I_0 e^{-\frac{\mu(E_i)\rho}{\rho} d} \quad (3.1)$$

onde,

d - espessura da amostra;

μ - coeficiente linear de absorção do material da amostra (cm^{-1});

E_i - energia do fóton incidente;

μ/ρ - coeficiente mássico de absorção do material da amostra (cm^2/kg);

I_0 - intensidade do feixe inicial;

I - intensidade do feixe depois de atravessar a amostra;

No caso da técnica de Fluorescência de raio-x, a interacção dominante é a absorção fotoelétrica, que apresenta maior secção eficaz para as energias utilizadas [6].

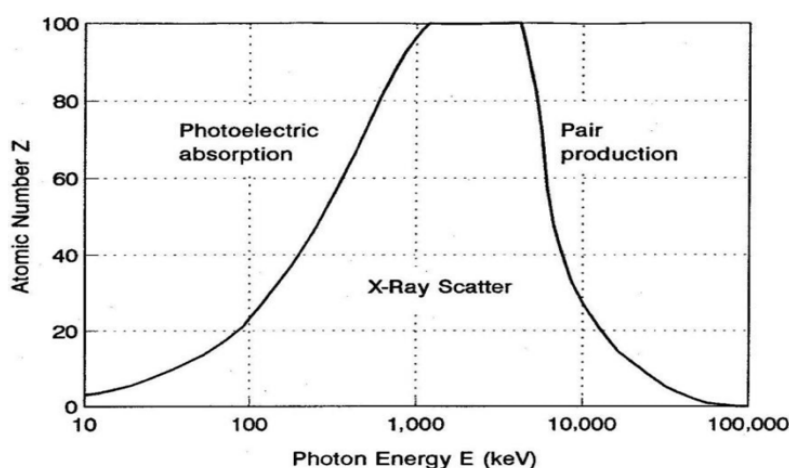


Figura 3.4: Efeitos predominantes dos raio-x em função da energia do feixe incidente (adaptado de [74])

3.1.2.1 Efeito fotoelétrico

O efeito fotoelétrico é um processo físico que ocorre quando um fóton incidente interage com o electrão ligado de um átomo, transferindo-lhe toda a sua energia. O fóton incidente é absorvido e o electrão, denominado de foto-electrão, é ejetado com energia igual à diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação do electrão.

A secção eficaz desta interacção é dependente do número atómico do meio absorvente e da energia do feixe de raio x. A probabilidade de ocorrer é máxima para fótons com energias iguais à energia de ligação do electrão ao átomo, aumentando em função do número atómico Z [75]. A energia de ligação do electrão ao átomo apresenta-se assim como um limiar, em que valores de energia inferiores a este, apresentam probabilidade nula do acontecimento. Como se verifica na figura 3.4, para energias tipicamente <1MeV, o efeito fotoelétrico é a interacção dominante dos raios-x com a matéria [70].

3.1.2.2 Dispersão de Rayleigh

Denomina-se dispersão de Rayleigh quando ocorre uma colisão elástica entre o fóton e os electrões fortemente ligados do átomo, nomeadamente das camadas internas. A nuvem electrónica, ao ser perturbada pelo fóton incidente irá irradiar energia na forma

de um outro fóton, com a mesma frequência e energia que o fóton incidente, sem ionizar o átomo. Neste processo, apenas a direção do fóton incidente é alterada, sem perda de energia (ou com uma perda mínima). A probabilidade desta dispersão ocorrer diminui com o aumento de energia do fóton incidente, tomando valores mais elevados para baixas energias e número atômico elevado [67, 75].

3.1.2.3 Dispersão de Compton

A dispersão de Compton ocorre quando um fóton de raio-x incidente colide com um electrão das camadas externas, resultando na perda de energia do fóton incidente e deflexão do mesmo [75]. Desta colisão resulta um electrão ejetado, com energia muito inferior à do fóton incidente [69]. Por sua vez, a energia do fóton disperso vai depender da energia do fóton incidente e do ângulo de dispersão, ilustrado pela figura 3.5. A probabilidade de ocorrer dispersão de Compton aumenta com a energia dos fótons incidentes e com a diminuição do número atômicos [69].

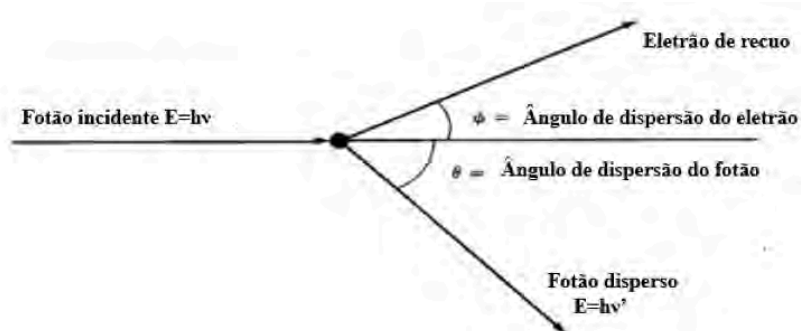


Figura 3.5: Esquema da dispersão de compton

3.1.3 Fluorescência de raio-x dispersiva em energia (EDXRF)

A fluorescência de raio-x dispersiva em energia permite determinar simultaneamente os vários elementos nos diferentes materiais, tanto líquidos e gasosos como sólidos. É um método rápido, preciso e não destrutivo da amostra, que requer pouco pré-tratamento e é muito utilizado em diferentes áreas da ciência e tecnologia. Tem como grande vantagem a alta precisão, exatidão e reprodutibilidade das medições. Para além disto, esta técnica é capaz de identificar a presença de diferentes elementos das amostras numa única medição, em relativamente curto tempo, possibilitando a utilização de uma grande variedade de amostras [68]. Permite ainda a obtenção de análises qualitativas como quantitativas dos diferentes elementos, com uma vasta gama de concentrações e sensibilidade na ordem dos $\mu\text{g/g}$.

Devido à absorção no ar e nas janelas dos detectores dos raios-x de baixa energia, a utilização de EDXRF não permite a detecção de elementos com número atômico (Z)

reduzido <13 [72]. A baixa penetração de raio-x em metais e as atenuações em estruturas estratificadas apresentam-se como dificuldades do EDXRF podendo, no entanto, ser contornadas [76].

O espectrómetro convencional de EDXRF utiliza uma fonte de excitação, suporte para a amostra, sistema de detecção de raio-x e um multicanal de análise de impulsos (MCA) [72]. A resolução em energia do espectrómetro é diretamente proporcional à resolução do detector, tipicamente um semiconductor de alta resolução como o Silício, com valores de 160eV ou menos, no caso dos detectores de deriva de silício, tal como o que será utilizado neste trabalho [69]. A fonte de excitação mais utilizada é o tubo de raio-x, porém outras fontes podem ser utilizadas, como fontes radioactivas ou radiação de sincrotrão [6].

Os detectores utilizados pela EDXRF estão maioritariamente de estado sólido, e produzem impulsos eléctricos após interacção com o raio-x proveniente da amostra. Os impulsos são proporcionais à energia do fóton recebido e característicos de cada elemento da amostra, podendo assim ser amplificados e integrados pelo multicanal. Para cada impulso gerado é necessário um certo tempo para o integrar, o tempo morto, não sendo possível durante este mesmo período registar outro qualquer pulso [71].

Por fim, o multicanal analisa a carga coletada nos eléctrodos do detector relacionando com a energia dos fótons, permitindo deste modo, qualificar os diferentes elementos presentes na amostra [68, 71].

3.1.3.1 μ -EDXRF

A μ -EDXRF é uma das configurações do método de EDXRF, que permite analisar amostras não-homogéneas, irregulares e de dimensões reduzidas [77], em que os raios-x são focados através da incorporação de um tubo mono ou policapilar, como se mostra na figura 3.6 [67]. A utilização do tubo policapilar, como apresentado na figura 3.7, foca o feixe num diâmetro de 25 μm , aumentando a intensidade da irradiação e melhorando a medição de elementos traços e respectiva resolução espacial [78]. Os capilares óticos do tubo, com diâmetros na ordem de um ou dois μm , coletam os raios-x divergentes e direcionam-nos, concentrando-os numa região muito reduzida da amostra [79]. Isto é conseguido através de sucessivos fenómenos de reflexão total, sem atenuação significativo ou dispersão dos feixes de raio-x (excepto na direcção pretendida) [78]. As medições obtidas são de alta resolução espacial e grande rapidez de aquisição [77], sob a forma de mapas elementares ou espectros que podem ser pontuais. Existe ainda a possibilidade de se realizar as análises em vácuo, tendo como vantagem a melhor detecção de elementos de baixo Z uma vez que tais elementos não são absorvidos pelo ar[78].

O espectrómetro utilizado neste trabalho foi o M4 *Tornado*TM da Bruker, Alemanha, cuja descrição se encontra na secção 4.

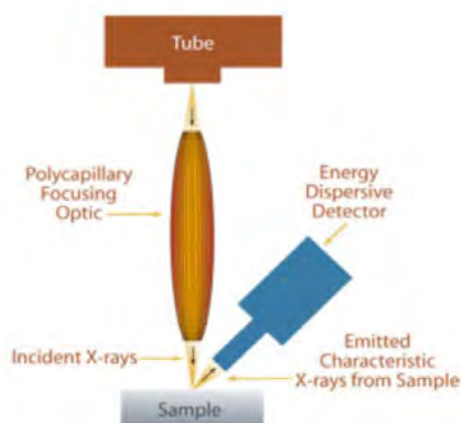
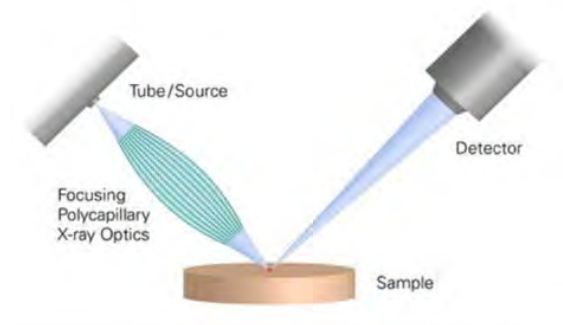
Figura 3.6: Esquema da configuração do μ -EDXRF [79]

Figura 3.7: Esquema da configuração do policapilar [78]

3.1.3.2 EDXRF com geometria triaxial

O método de fluorescência de raio-x com geometria triaxial utiliza uma configuração geométrica de 3 planos perpendiculares que explora o fenômeno de polarização e melhora a relação sinal-ruído através da remoção da radiação de fundo, proveniente do *Bremstrahlung* do tubo. A principal origem da radiação de fundo provém da dispersão da radiação da fonte pela amostra resultando em ruído espectral [67].

A utilização de um alvo secundário, um polarizador, entre a fonte e a amostra, possibilita a obtenção de uma fonte quase monocromática. Um feixe primário de raio-x produzido pela fonte irá interagir com o alvo secundário, originando um feixe secundário. Esse feixe secundário é colimado para atenuar a divergência dos raios-x que incidem na amostra, melhorando os limites de detecção da técnica [80]. De forma a eliminar a componente *bremstrahlung*, é colocado um detector a um ângulo de 90°, ortogonal ao plano criado pelo feixe da fonte de raios-x e feixe disperso pelo alvo secundário [81]. A utilização de uma geometria tri-axial, esquematizado na figura 3.8, permite a detecção de elementos traço existentes em menor quantidade, facilitando uma caracterização qualitativa e quantitativa mais completa da amostra [67].

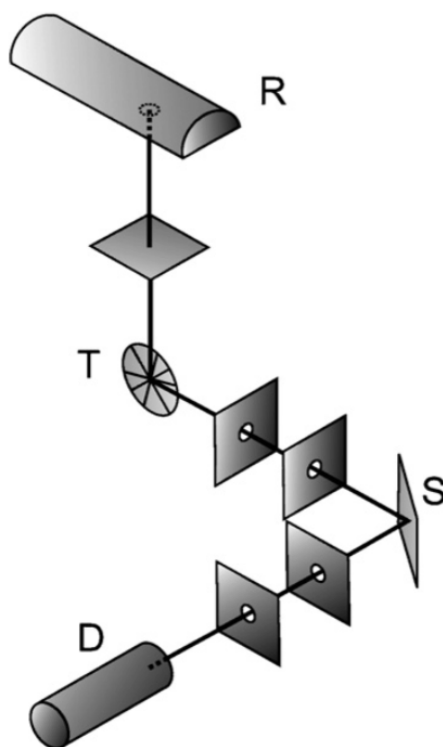


Figura 3.8: Esquema da configuração do método de EDXRF com geometria triaxial; R-tubo de raio-x; T-alvo secundário; S-amostra e D-detector (adaptado de[8])

3.1.3.3 Artefactos espectrais

Os espectros obtidos pela técnica de EDXRF apresentam picos característicos dos elementos, permitindo uma identificação simples das linhas espectrais. Porém, para além destes, existem também artefactos resultantes de outras fontes. Podem estes ser os picos escape, picos soma e picos de difração [67].

Os picos escape resultam da interação de raios-x com o material do detector, provocando efeito fotoelétrico e emissão e reabsorção dos raios-x característicos do silício. Para valores superiores ao limiar de ionização (1,83 KeV) e caso o efeito fotoelétrico ocorra à superfície do detector, os raios-x podem escapar do detector, não havendo coleção da carga. Deste modo, perde-se uma quantidade de energia, correspondente a 1,74KeV (da risca K_{α} do Silício), que vai corresponder no espectro ao pico original menos este valor de energia.

Os picos somas ocorrem quando 2 (ou mais) raios-x chegam simultaneamente ao detector e não são reconhecidos como eventos distintos. Este pico apresenta-se como a soma da energia dos dois fotões [71].

Para amostras que contenham materiais cristalinos podem ocorrer difrações de Bragg. Ao incidir na amostra, a radiação do tubo é dispersa segundo a lei da difração de Bragg e quando coletada, origina picos adicionais no espectro cuja energia varia com a orientação da amostra [82].

3.1.3.4 Espectro Característico

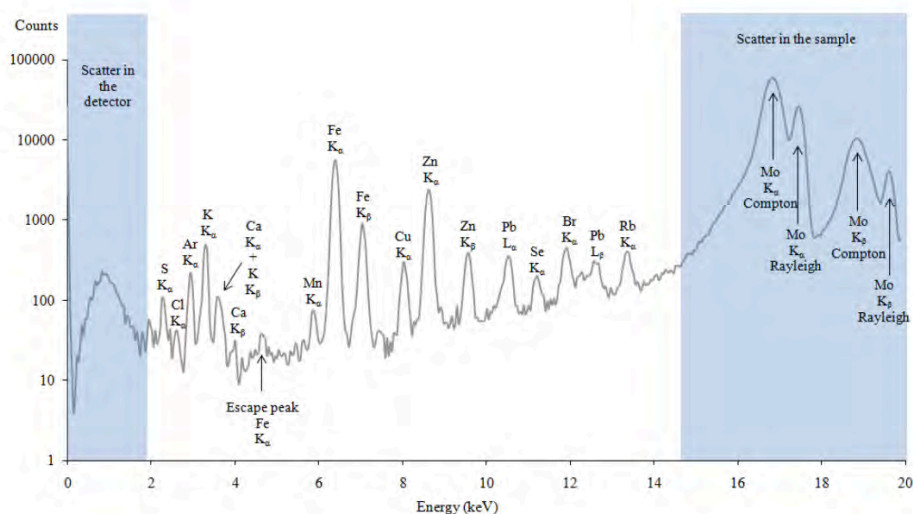


Figura 3.9: Espectro característico de uma amostra através de análise por EDXRF com geometria triaxial [70]

O espectro obtido pela EDXRF é resultado de uma componente contínua, da radiação de Bremsstrahlung, picos característicos dos diferentes elementos e por vezes ainda, os artefactos espectrais. Tal como apresentado na figura 3.9, este pode ser dividido em 3 regiões: altas energias, baixas energias e energias intermédias.

A região de altas energias, acima de 15 KeV, é composta por picos de dispersão elástica e inelástica e corresponde aproximadamente a 90% das contagens obtidas. No caso da análise através de μ -EDXRF, está presente nesta região o pico característico do Ródio, material de que é composto o alvo do tubo de raio-x. Para a análise através de EDXRF com geometria triaxial, encontra-se os picos do molibdénio (Mo) [70].

A região de mais baixa energia, inferior a 2KeV, é composta por picos escape e ruído eletrónico do detector.

Por fim, a zona de energia intermédia (entre 2-15 KeV) apresenta picos característicos das linhas K e L dos elementos da amostra e é esta a região de interesse para análise [70].

3.1.3.5 Limites de Detecção

O limite de detecção da EDXRF encontra-se na gama dos ppm, (parte por milhão ou ainda $\mu\text{g/g}$) [83, 84]. O limite de detecção refere-se à concentração mínima de um elemento que pode ser detectada numa amostra [67]. Para a espectrometria de fluorescência de raio-x dispersiva em energia, este pode ser calculado através da fórmula [11, 85]:

$$DL = \frac{3Ci \times \sqrt{N_b}}{N_p} \quad (3.2)$$

onde,

C_i - concentração do elemento

N_B - número de contagens de fundo

N_p - número de contagens correspondentes ao pico do elemento

3.2 ICP-AES

A espectrometria de emissão atômica por plasma induzido é uma técnica analítica de análise multielementar com ampla faixa de concentração dinâmica, boa velocidade analítica e relativamente de baixo custo associado (ainda que muito alto quando comparado com EDXRF)[86]. Permite analisar aproximadamente 60 elementos simultaneamente com diferentes matrizes, tanto sólidas e líquidas como orgânicas e inorgânicas [87].

À semelhança do funcionamento do XRF, a detecção e quantificação dos diferentes elementos é obtida através da radiação característica da amostra, pelo seu comprimento de onda [88, 89]. A amostra é exposta a um plasma de argon gasoso a altas temperaturas (6000-10000 K), que propicia a excitação e atomizações dos compostos, emitindo fótons e detectando os vários elementos [87].

O sistema de ICP-AES é constituído por uma fonte de plasma induzido, um gerador de radiofrequência, e um detector de emissão atômica [88, 90]. Estes sistemas têm algumas limitações e requerimentos tais como a necessidade de dissolução da amostra e, portanto, carácter destrutivo da mesma, interferências associadas e incapacidade de detecção de alguns não metais e gases inertes [87].

Este tipo de espectrometria apresenta limites de detecção até partes por bilião (ppb) [88].

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bioensaio de exposição

Neste estudo foram utilizados peixes zebra (*D. rerio*) aclimatados na sala de experimentação animal do DCEA da FCT-UNL, em tanques de 100L de volume. Os peixes provenientes do Sudeste Asiático, foram adquiridos a importadores nacionais e mantidos em condições laboratoriais controladas (pH a 7.2 ± 0.2 ; T(°C) a $20^\circ\text{C} \pm 1$;) durante 15 dias. Após este período de aclimação, iniciou-se o bioensaio de exposição ao chumbo com uma solução de acetato de chumbo (II) tri-hidratado, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_3)_2$, da Merck (Alemanha). Utilizaram-se assim 5 grupos de 3 indivíduos ($n=3$), aleatoriamente distribuídos, com peso médio de $0,4 \pm 0,2$ g e comprimento médio de $2,8 \pm 0,3$ cm, sendo um deles o grupo de controlo com 6 indivíduos ($n=6$). Os peixes foram distribuídos por 5 tanques, um para cada concentração a testar, de 15L de volume com arejamento contínuo e água filtrada, como é possível ver nas figuras 4.1 e 4.2. Testaram-se as concentrações de $10 \mu\text{g/g}$, $20 \mu\text{g/g}$, $40 \mu\text{g/g}$ e $100 \mu\text{g/g}$. A exposição ocorreu durante 7 dias e com renovação da água a cada 36 horas, de acordo com as normas para experimentação com peixe-zebra descritas pela “OECD Zebrafish guidelines”. Durante o período de exposição os peixes foram alimentados *ad libitum* diariamente com flocos comerciais, da Eco vita.

Realizou-se ainda um bioensaio adicional, nas mesmas condições, destinado a estudos de actividade enzimática. Previamente, com o intuito de se otimizar o procedimento experimental, realizaram-se anteriormente ainda 2 bioensaios preliminares nas mesmas condições, com concentrações de chumbo diferentes. Após se verificar que o chumbo apresentava efeitos nos *Danio rerio* e dentro dos limites de detecção da técnica, procedeu-se ao bioensaio final referido anteriormente. Não se registaram mortalidades nos bioensaios realizados. Após o período experimental, os peixes foram eutanasiados por asfixia e congelados a -80°C para posterior análise.



Figura 4.1: Tanques de bioexposição de *Danio rerio* ao Pb



Figura 4.2: Modelo biológico (*Danio rerio*)

4.2 Preparação das Amostras

4.2.1 Análise por μ -EDXRF e EDXRF com geometria Triaxial

Os peixes zebra foram cortados longitudinalmente (em duas metades) com o auxílio de uma lâmina de barbear e liofilizadas a frio durante 48 horas. Posteriormente, foram montadas em folhas de mylar e fixas em slides (50x50mm). Recorreu-se a um pouco de cola UHU para colar o peixe zebra ao mylar, não contendo este nenhum elemento capaz de ser detetado pelas técnicas utilizadas. As amostras foram devidamente identificadas com o número e concentrações a que foram expostas, como se apresentam na figura 4.3.

Procedeu-se ainda à pesagem e medição dos peixes, tanto frescos como liofilizados, apresentando-se na tabela A.1 no apêndice A.

4.2.2 Análise por ICP-AES

Para análise da técnica de ICP-AES e atendendo a que a técnica só analisa amostras em solução aquosa, as amostras foram digeridas com HNO_3 (Sigma-Aldrich, Alemanha), a 60°C durante 72 horas. Assim, primeiramente procedeu-se à identificação dos frascos aos quais se adicionaram 2 mL de HNO_3 (69% puriss p.a) e o correspondente peixe. Por fim e após digeridas integralmente as amostras, adicionou-se a cada uma delas 10 μ l de H_2O_2 e perfez-se com H_2O destilada para um volume final de 10mL.



Figura 4.3: Montagem das amostras para análise em EDXRF

4.2.3 Extração de proteínas para Estudo enzimático

Para o estudo de biomarcadores foram eutanasiados 5 grupos de *Danio rerio*, de controlo (n=6), 10 $\mu\text{g/g}$ (n=3), 20 $\mu\text{g/g}$ (n=3), 40 $\mu\text{g/g}$ (n=3) e 100 $\mu\text{g/g}$ (n=3).

As amostras utilizadas para o estudo dos biomarcadores foram homogeneizadas em 2mL de solução salina de tampão fosfato (PBS, pH 7,4) com auxílio de um homogeneizador, T10 basic Ultra Turrax (Ika Alemanha).

Após homogeneizadas, foram centrifugadas durante 10 minutos a 4°C e posteriormente congeladas (-80°C) e armazenadas até posterior análise.

Adicionalmente, pelo método de Bradford (1976) [91], calculou-se a quantidade total de proteína, de forma a normalizar os resultados dos biomarcadores. Para tal, todos os resultados foram divididos pela quantidade total de proteína.

4.3 Espectrómetros de EDXRF

Neste trabalho, as análises quantitativas foram realizadas utilizando o sistema de μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial.

4.3.1 Espectrómetro de μ -EDXRF

O espectrómetro utilizado para análise por μ -EDXRF foi o M4 *Tornado*TM da Bruker, Alemanha, com um policapilar capaz de focar o feixe com uma resolução lateral de 25 μm [78].

O espectrómetro é alimentado por um gerador HV Alta Tensão (High Voltage) de baixa potência e a detecção da radiação fluorescente é realizada por meio de um detector dispersivo em energia SDD, *XFLASH*TM, com área sensível de 30 mm^2 . Possui um tubo de raios-X, com um ânodo de ródio (Rh), com capacidade de fornecer 50kV e corrente até 600 μA e ainda uma gama de filtros para filtrar a radiação proveniente do tubo.

As amostras são colocadas numa câmara de vácuo com uma plataforma amovível, que permite obter mapeamentos e análises de diferentes áreas [77].

Os mapeamentos da distribuição elementar nos tecidos do *Danio rerio* foram processados com uma tensão de 50kV e 600 μ A e aplicação de um filtro 100 μ m Al/50 μ Ti /25 μ m Cu. As análises foram realizadas em vácuo, a uma pressão de 20 mbar, espaçamento entre pixeis de 15 μ m, e uma velocidade de 0,66 segundos/pixel [92].

Configurou-se ainda para cada análise a realização de 7 ciclos, em modo de mapeamento em serpentina cujo tempo de aquisição resultou em aproximadamente 2 horas. Os elementos encontrados nas várias amostras e consequentemente mapeados, foram o P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr e Pb.

Para posterior quantificação de tecidos alvo seleccionaram-se manualmente no Tornado as áreas de cada órgão, tentando-se manter um padrão para todas as análises.

4.3.2 Espectrómetro de EDXRF com geometria triaxial

De forma a comparar os resultados, as amostras foram também analisadas por um espectrómetro de EDXRF com geometria triaxial do Laboratório de física atómica da FCT-UNL. Este aparelho é constituído por um tubo de raios-X da Phillips, com ânodo de tungsténio (W) e alvo secundário de molibdénio (Mo) [11, 92].

Utilizou-se uma geometria triaxial entre a amostra, o tubo de raio-x e o alvo secundário, com o propósito de diminuir a radiação de fundo, permitindo a obtenção de uma fonte com linhas K_{α} e K_{β} de Mo, de energias 17,44 e 19,60 KeV [93]. A radiação característica emitida é detectada por um detector de Silício Lítio, Si(Li), da Oxford Instruments (Inglaterra) com uma janela de 8 μ m e área de 30mm². Faz ainda parte deste sistema um colimador de prata, em frente ao detector, que restringe a área efetiva de detecção. O suporte da amostra encontra-se a 27mm do detector e o feixe incidente de raio x tem uma forma elíptica, de 20mm por 15mm [80].

De forma a arrefecer o detector, é utilizado nitrogénio líquido.

Para as amostras em questão, o gerador de raio-x foi configurado para um tensão de 50kV e corrente de 20mA para um tempo de aquisição de 1000 segundos para cada espectro.

4.3.3 Processo e método de quantificação

A análise quantitativa é utilizada para obtenção de informação acerca da concentração relativa de cada elemento presente na amostra. Esta pode ser adquirida através de variados métodos, entre elas o método dos parâmetros fundamentais [68]. O método de parâmetros fundamentais utiliza os parâmetros fundamentais, tais como o rendimento de fluorescência, intensidade das transições, secções eficazes e outros, de forma a relacionar a intensidade dos picos com a concentração do elemento. Esta relação pode ser descrita pela equação 4.1 [11]:

$$I_i = I_o m K_i C_i A_i \quad (4.1)$$

onde,

I_o - intensidade do feixe de raios-x

K - factor de calibração

A_i - factor de atenuação

m - espessura da amostra (g/cm²)

Devido à atenuação no detector, a radiação de raios-x de baixa energia e consequentemente os elementos leves não podem ser detectados. Contudo, nas amostras biológicas, estes elementos são os que constituem maioritariamente a matriz e são, portanto, muito significativos para o fator de atenuação sendo necessário a calibração do sistema.

A calibração é feita com base em *Standard Reference Material* (Material de referência) (SRM) [68].

Para as amostras utilizadas, constituídas por carbono, oxigénio e outros elementos leves, foi criada uma matriz para Peixes zebra. Este ficheiro de método quantitativo *zebrafish.mtd* foi previamente ajustado para amostras biológicas. Foi comparado através de padrões de referência de amostras biológicas, "Bush branches"[94], "Orchard Leaves"[95], "Animal Blood"[96] e "Bovine Liver"[97] disponíveis no laboratório. Estes padrões foram analisados pelo Tornado M4 e os resultados comparados com os valores reais de referência de modo a modificar as sensibilidades individuais de cada elemento e certificar o ficheiro utilizado. De seguida apresentam-se na tabela 4.1 os valores de quantificação dos padrões "bush branches" e "Orchard Leaves" quando este método foi aplicado e correspondentes valores certificados. As incertezas experimentais tiveram em conta as discrepâncias entre os resultados dos padrões e as suas concentrações certificadas.

4.3.4 Limites de detecção

Os limites de detecção e quantificação da técnica de μ -EDXRF foram calculados com recurso aos padrões de referência *Bush Branches* da National Bureau of Standards (NBS). Estes padrões fornecem informações acerca da concentração do elemento, contagens de fundo e contagens correspondentes ao pico do elemento.

Através da equação 3.2 calculou-se o limite de detecção e quantificação para o chumbo, sendo o valor mais adequado de 4,54 μ g/g. Consequentemente, só a partir deste valor é que a técnica consegue garantir e detectar o chumbo. Para valores abaixo deste, não é então possível aferir acerca da concentração presente [85].

4.3.5 Incertezas associadas

A análise quantitativa XRF tem associadas incertezas, que derivam da combinação de erros estatísticos e erros sistemáticos [85].

Tabela 4.1: Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Bush braches e Orchard Leaves com os respectivos valores certificados.

Bush branches			Orchard Leaves		
Elementos	Tornado- $\mu\text{g/g}$	SRM- $\mu\text{g/g}$	Elementos	Tornado- $\mu\text{g/g}$	SRM- $\mu\text{g/g}$
Mg	6695	4800	Mg	7603	6200
P	624	1000	P	1685	2100
S	8357	7300	S	2347	2300
Cl	22874	19200	Cl	688	700
K	10627	9200	k	15751	14700
Ca	20954	16800	Ca	20958	20900
Mn	76	61	Mn	90	91
Fe	1278	1070	Fe	279	300
Cu	11	7	Cu	14	12
Zn	71	55	Zn	a 28	25
Br	16	3	Br	11	10
Sr	186	246	Sr	11	37
Pb	46	47	Pb	25	45
Na	18994	19600			
Al	1156	2000			
Ti	99	95			
Si	2898	6000			

Os erros estatísticos influenciam a precisão do instrumento e resultam maioritariamente da conjugação da medição dos picos de raio-x, curva de calibração e matriz utilizada. [98].

No caso dos erros sistemáticos, que influenciam a exactidão, estão associados à preparação da amostra, procedimento de calibração e erros associados ao próprio instrumento. Entre elas destaca-se os erros correspondentes ao corte e espessura das amostras e ainda a heterogeneidade dos peixes [85, 99].

Atendendo a que medição da concentração elementar em cada órgão varia de ponto para ponto, é possível calcular a incerteza associada à média ponderada através da expressão 4.2, da incerteza:

$$\mu(\bar{X}_p i) = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)} \times \sqrt{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)^4} \quad (4.2)$$

onde,

\bar{X}_p - média ponderada da medição de cada órgão para elemento i ;

X_i - concentração do elemento i ;

N - número de medições efectuadas;

Neste estudo em questão as incertezas associadas à medição da concentração dos elementos derivam predominantemente da incerteza estatística da média ponderada que contém em si mesma a incerteza sistemática das medições do aparelho e do desvio padrão.

A incerteza final é dada pela raiz quadrada da soma quadrática das duas incertezas, a da média ponderada e do desvio resultante das várias medições [100], como se mostra na equação 4.3.

$$\mu(\overline{X}_f) = \sqrt{(\mu(\overline{X}_p))^2 + \sigma^2} \quad (4.3)$$

onde,

$\mu(\overline{X}_f)$ - incerteza final

$\mu(\overline{X}_p)$ - incerteza associada à média ponderada

σ - desvio padrão das medições efectuadas

Os erros sistemáticos e a consequente incerteza de medição do aparelho é bastante baixa, pelo que a incerteza associada à variabilidade biológica, que está reflectida no desvio padrão das mesmas, é dominante.

4.4 ICP-AES

As amostras analisadas por EDXRF foram posteriormente analisadas por ICP-AES, efectuadas pelo laboratório de Análises do centro de investigação REQUIMTE do Departamento de Química da FCT-UNL.

O equipamento utilizado foi o Horiba Jobin-Yvon Ultima, equipado com um gerador RF de 40,68 MHz, monocromador Czerny-Turner com 1,00 m (sequencial), amostrador automático AS500 e dispositivo CMA(*Concomitant Metals Analyser*) que permite determinação simultânea de metais à escala de ppb. [101].

A precisão desta técnica foi verificada através de materiais de referência, SRM, cujos resultados são apresentados na tabela D.3, presente no apêndice D.

4.5 Biomarcadores

Para a determinação dos diferentes biomarcadores foram utilizados diferentes protocolos. Todos os resultados enzimáticos e de HSP70 foram normalizados dividindo os valores obtidos pelos valores de proteína total obtidos pelo método de Bradford(1976)[91], para cada amostra.

4.5.1 Peroxidação Lipídica (LPO)

Para determinação da lipoperoxidação foi realizado um ensaio com base no protocolo TBARS, com substâncias reactivas ao Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ohkawa, H et al, 1979) [102]. As absorvâncias das amostras foram lidas após um minuto a 530nm e posteriormente quantificadas através de uma curva de calibração obtida com padrões de MDA (0 a 100 μ M/ml) da Merck Millipore, Portugal.

4.5.2 Superóxido Dismutase (SOD)

O superóxido dismutase foi determinado de acordo com o protocolo descrito por MCCord and Fridovich (1969)[103], adaptado para microplaca de 96 poços. Este método utiliza o citocromo c, a 25°C e pH=7,8, a absorvância foi lida a 550 nm durante 5 minutos. No final, os resultados apresentam-se em termos de percentagem de inibição de SOD.

4.5.3 Catalase (CAT)

O estudo enzimático para a determinação da atividade da Catalase foi realizado de acordo com os protocolos descritos anteriormente por Johansson e Borg (1988)[104] e adaptados para uma microplaca de 96 poços. Para obtenção da curva de calibração foram utilizados padrões de formaldeído (0 a 150 μ M) e a actividade enzimática da catalase correspondeu à formação de 1,0nmol de formaldeído por minuto a 25°C. A absorvância foi lida a 540 nm durante 1 minuto.

4.5.4 HSP70

A concentração da enzima HSP70 foi determinada através do ensaio de "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) de acordo com o protocolo estabelecido por Madeira *et al.* (2017)[105] e adaptado para uma microplaca de 96 poços. As amostras foram lidas a 405 nm durante 1 minuto e a curva de calibração foi calculada através de padrões de HSP70 (0-2 μ g/ml).

4.5.5 GPx

A actividade da glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.19) foi obtida espectrofotometricamente a 340 nm durante 6 minutos a 25°C, medindo o consumo de β -Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) como reagente numa reacção secundária catalisada pela Glutathione Redutase. O ensaio enzimático foi efectuado segundo o protocolo descrito por Lawrence e Burk (1976) [106].

4.5.6 Acetilcolinesterase (AChE)

A actividade da AChE foi obtida através do ensaio acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7;AChE) por quantificação de tióis, segundo um método optimizado de Ellman e adaptado para 96 poços e com químicos da Sigma-Aldrich [107–109]. A absorvância foi lida a 415 nm e durante 10 minutos.

4.5.7 Análise estatística

A análise estatística dos Biomarcadores foi realizada com o teste U não paramétrico de Mann-Whitney U. Este teste foi utilizado para determinar as diferenças entre as amostras expostas a diferentes concentrações e os de controlo. Utilizou-se o software Statistica 8.0

(Statsoft, 2007, Tulsa, OK, USA), com nível de significância de 5% ($p < 0.05$) para todos os testes.

APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Os estudos realizados permitiram obter uma análise qualitativa e quantitativa. Neste capítulo serão apresentadas os resultados obtidos assim como a discussão e análise dos mesmos.

5.1 Análise qualitativa

5.1.1 Distribuição elementar nos tecidos de *Danio rerio*

Os mapeamentos adquiridos através da técnica de μ -EDXRF permitiram observar a distribuição simultânea dos diversos elementos como o cálcio (Ca), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e chumbo (Pb) nos diferentes tecidos alvo do peixe-zebra. O esqueleto ósseo e as barbatanas são constituídos maioritariamente por cálcio e os olhos por zinco, como está demonstrado nas figuras 5.1 e 5.2. O ferro e o cobre, elementos presentes no sangue e associados ao sistema circulatório, acumulam-se predominantemente nas vísceras, brânquias e no coração [110, 111].

No caso do chumbo, os mapeamentos revelam bioacumulação nas vísceras e zona das brânquias (figuras 5.3 e 5.4). No entanto, os peixes expostos a 20 μ g/g e 40 μ g/g apresentam maior acumulação do chumbo na zona das brânquias contrastando com os peixes expostos a 10 μ g/g e 100 μ g/g que apresentam maior deposição na zona visceral.

A bioacumulação das brânquias pode ser justificada pelo elevado número de trocas gasosas e pelo contacto directo com a água contaminada [66]. As brânquias são o primeiro órgão em contacto com a água contaminada e apesar de entrar por todo o corpo (devido à característica hipertónica do peixe), esta é a principal via de exposição do chumbo. Depois de entrar no organismo, e através do sistema circulatório, o chumbo é distribuído

por todos os órgãos e a sua bioacumulação dependerá da afinidade deste metal com cada um deles[4, 22].

A zona visceral inclui o sistema gastrointestinal (fígado, intestinos) e rins[66]. De forma a contribuir na excreção e desintoxicação dos metais, estes órgãos bioacumulam e apresentam elevados valores de chumbo. Ainda nesta zona, estão localizadas as gónadas, compostas por lípidos e com grande afinidade com o chumbo [112].

No que diz respeito à distribuição elementar e de um modo geral (excepto o chumbo), verifica-se assim um padrão comum dos elementos nos diferentes peixes.

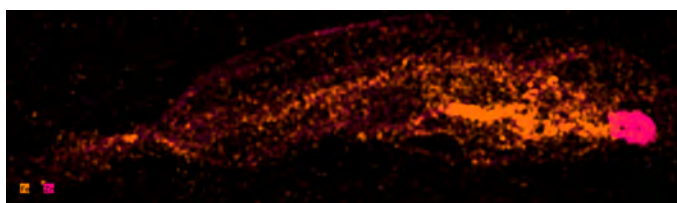


Figura 5.1: Mapa exemplificativo da distribuição do ferro (laranja) e zinco (rosa) obtido por μ -EDXRF

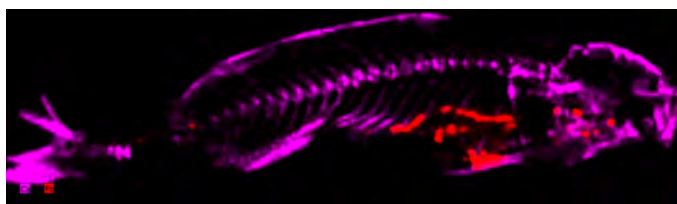


Figura 5.2: Mapa exemplificativo da distribuição do cálcio (rosa) e chumbo (encarnado) obtido por μ -EDXRF

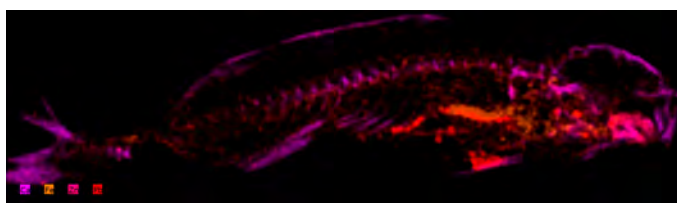


Figura 5.3: Mapa da distribuição multielementar de um peixe exposto a $10\mu\text{g/g}$ obtido por μ -EDXRF

5.2 Análise quantitativa

A análise qualitativa permitiu observar a distribuição elementar e preferencial ao longo do peixe. No entanto não permite aferir acerca da quantificação e valores de deposição do chumbo, e outros elementos, no *Danio rerio*. Com esse intuito, procedeu-se à análise quantitativa, que utiliza o método referido na secção 4.3.3.

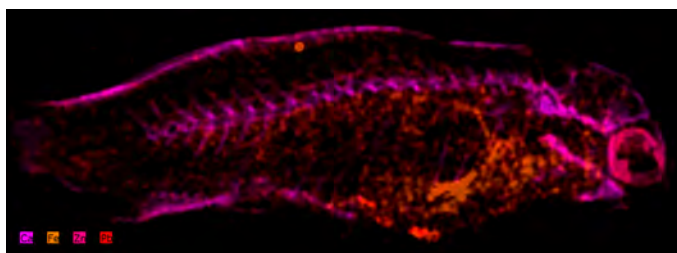


Figura 5.4: Mapa da distribuição multielementar de um peixe exposto a $100\mu\text{g/g}$ obtido por μ -EDXRF

5.2.1 Análise por μ – EDXRF

Para se obter a análise por μ -EDXRF foi necessário definir os tecidos alvos. O software do aparelho de μ -EDXRF, Tornado M4 da Bruker, permite seleccionar manualmente as áreas de análise, como exemplificado na figura 5.5. Os tecidos alvos definidos foram as brânquias, cérebro, área dorsal, espinha, vísceras e peixe inteiro. Atendendo a que todos os peixes possuem a sua variabilidade intrínseca bem como a variabilidade no corte, a dimensão e localização das áreas variaram de peixe para peixe.

Após se ter quantificado cada área de cada peixe, chegou-se à conclusão que os tecidos do cérebro, dorsal e espinha apresentavam valores de chumbo Abaixo do Limite de Detecção (*Below Detection Limit*) (BDL), pelo que não foi possível aferir acerca da concentração de Pb nestas zonas. Assim, apenas se considerou para análise as zonas das brânquias, vísceras e o peixe inteiro. Para cada grupo obteve-se a média ponderada da concentração de chumbo para os respectivos órgãos. De forma a facilitar as comparações dos resultados obtidos, foram realizados gráficos em função dos órgãos e com a informação da concentração nas diferentes concentrações de Pb a que os peixes foram expostos.

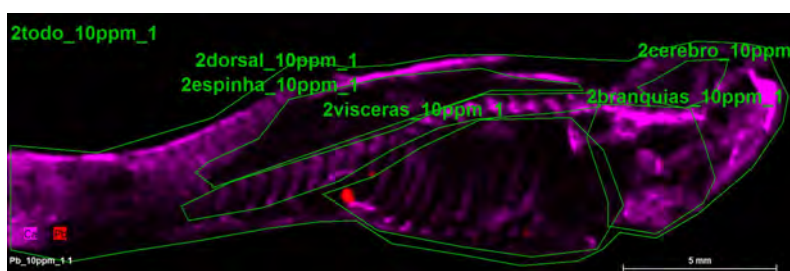


Figura 5.5: Figura exemplificativa da selecção dos tecidos alvos a analisar - peixe exposto a $10\mu\text{g/g}$

Na figura 5.6 estão representadas as concentrações de Pb nas brânquias, vísceras e no peixe inteiro em função da concentração nominal a que foram expostos. Observa-se que a bioacumulação de Pb variou para os diferentes grupos e para cada órgão. Constata-se que o grupo exposto a $20\mu\text{g/g}$ foi o que, de um modo geral, apresentou zona de maior bioacumulação nas brânquias, confirmando o referido na análise qualitativa. O grupo de peixes exposto a uma concentração nominal de $10\mu\text{g/g}$ apresentou maior bioacumulação

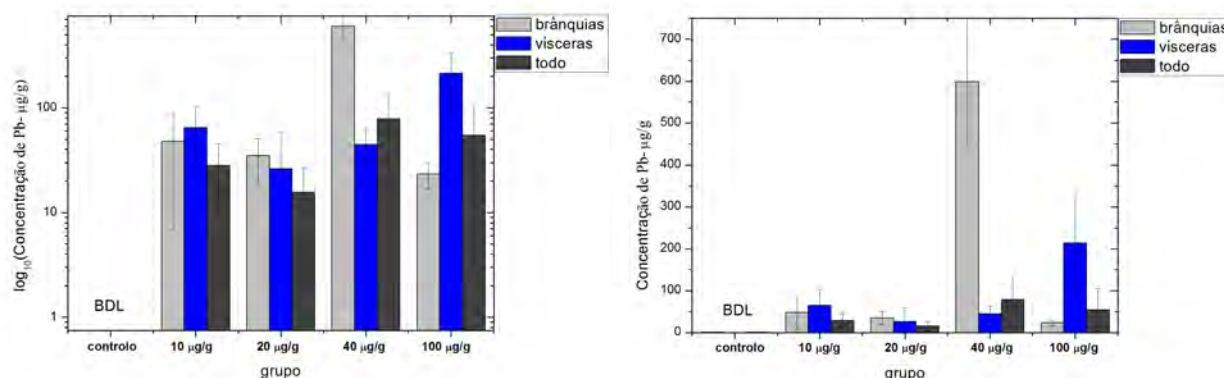


Figura 5.6: Gráficos referente às diferentes concentrações de cada órgão obtidas pela técnica de μ -EDXRF para cada grupo de concentração exposto ao Pb

na área visceral.

Em conjunto com os peixes expostos a $20 \mu\text{g/g}$, aparentam ser os dois grupos com bioacumulação mais uniforme entre os órgãos analisados. Não esquecendo que as concentrações utilizadas nos bioensaios foram muito elevadas e bastante diferentes entre si e considerando que estes grupos foram expostos a concentrações mais baixas, poderão assim apresentar bioacumulações gerais mais semelhantes.

Os grupos expostos $40 \mu\text{g/g}$ e $100 \mu\text{g/g}$ apresentam maior bioacumulação nas brânquias e vísceras, respectivamente. A concentração de chumbo nestes locais para estes grupos é significativamente maior.

Bioacumulação nas brânquias

As brânquias são o primeiro órgão interno a entrar em contacto com a água contaminada de chumbo. Por essa razão e por serem altamente irrigadas, espera-se uma bioacumulação significativa do metal nos seus tecidos.

As variações estatisticamente significativas, no que diz respeito às brânquias face ao grupo de controlo, encontram-se nos grupos expostos a $20 \mu\text{g/g}$, $40 \mu\text{g/g}$ e $100 \mu\text{g/g}$ (figura 5.7). Devido à heterogeneidade das concentrações obtidas pelo grupo de $10 \mu\text{g/g}$, este resulta num desvio padrão muito elevado, pelo que não é estatisticamente distinto do grupo de controlo. Adicionalmente, quando comparados estatisticamente os grupos entre eles, com excepção para os grupos de $10 \mu\text{g/g}$ vs $20 \mu\text{g/g}$ e $10 \mu\text{g/g}$ vs $100 \mu\text{g/g}$, todos apresentam diferenças consideráveis de valores.

A bioacumulação para este órgão não evidencia nenhuma tendência significativa, no entanto verifica-se um aumento muito substancial da concentração das brânquias dos peixes submetidos a $40 \mu\text{g/g}$. Apesar de se desconhecer a razão pela qual apenas este grupo apresentou este valor de concentração, pensa-se que possa estar associado a alguma contaminação prévia, doença, baixa resistência imunitária, ou mesmo o sexo e património genético. Devido a essa mesma razão, estudou-se a bioacumulação de Pb tendo em conta o sexo dos peixes, no subcapítulo 5.2.1.1.

Através dos mapeamentos obtidos pela técnica de μ -EDXRF percebeu-se também que cada um dos grupos expostos a $20\mu\text{g/g}$ e $40\mu\text{g/g}$ apresentava um peixe com corte imperfeito e que uma das metades apresentava parte dos 2 olhos. Isto por vezes acontece devido ao facto de os peixes terem um tamanho reduzido e não ser fácil o seu manuseio e corte, ainda que o corte seja feito com os peixes congelados a uma temperatura de -80°C . Provavelmente devido ao corte na diagonal, uma das metades do peixe recebeu toda a estrutura branquial ou sobrepôs com uma outra estrutura, podendo ter contribuído para o aumento da concentração de chumbo nesta análise. O mapeamento exemplificativo desta assimetria encontra-se na figura 5.8.

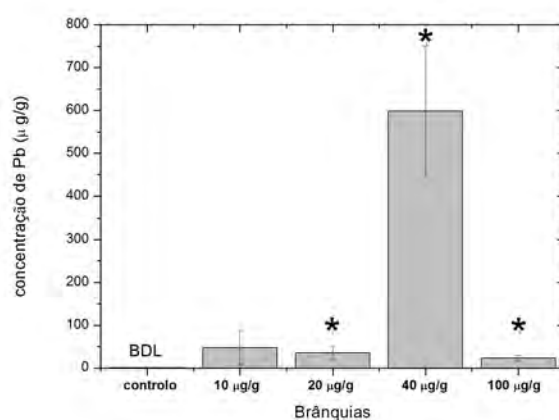


Figura 5.7: Gráfico da concentração média de Pb nas brânquias para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo de controlo.

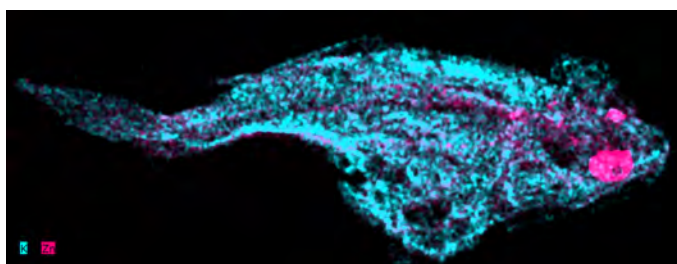


Figura 5.8: Mapeamento obtido através da técnica de EDXRF de um peixe exposto a $40\mu\text{g/g}$ com corte não simétrico

Realizou-se uma comparação da bioacumulação face ao valor de concentração nominal a que foram expostos, representado pelos factores de bioacumulação, presentes na tabela 5.1. Os factores de bioacumulação são calculados através da equação 5.1:

$$FA = \frac{C(\mu\text{g/g})}{VNC(\mu\text{g/g})} \quad (5.1)$$

com,

FA- Factor de bioacumulação;

C- concentração ($\mu\text{g/g}$);

VNC- valor nominal da concentração ($\mu\text{g/g}$);

Atendendo aos valores obtidos e considerando que o grupo exposto a $40 \mu\text{g/g}$ possa apresentar valores influenciados por factores externos, verifica-se uma tendência decrescente de bioacumulação, face à concentração nominal a que foram expostos.

Tabela 5.1: Tabela referente aos factores de bioacumulação das brânquias. BDL: abaixo do limite de detecção

valor nominal de concentração	concentração ($\mu\text{g/g}$)	factor de bioacumulação - brânquias
controlo	BDL	-
$10 \mu\text{g/g}$	50 ± 50	5
$20 \mu\text{g/g}$	60 ± 30	3
$40 \mu\text{g/g}$	600 ± 200	15
$100 \mu\text{g/g}$	30 ± 10	1/3

Bioacumulação nas vísceras

De acordo com a literatura, as vísceras são o principal órgão envolvido na desintoxicação e excreção do chumbo, pelo que, quando expostas a ele, acumulam grandes quantidades deste metal, resultado este que foi comprovado neste estudo. A figura 5.9 mostra a concentração de chumbo acumulado pelas vísceras, em função das diferentes concentrações a que os *Danio rerio* foram expostos. Estatisticamente, e comparando com o grupo de controlo, nenhum grupo apresentou valores com diferenças significativas neste órgão.

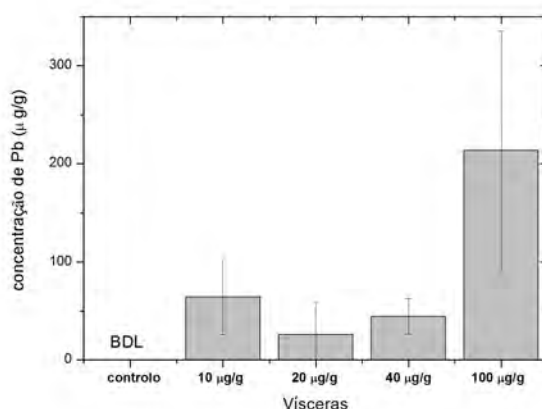


Figura 5.9: Gráfico da concentração média de Pb nas vísceras para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo de controlo.

Por outro lado, a análise do gráfico e das respectivas barras de incerteza mostra-nos uma tendência crescente de concentração de Pb visceral ao longo das concentrações nominais.

Quanto maior a concentração nominal administrada, maior é o esforço para a eliminação de toxinas e maior é a acumulação nas vísceras. À semelhança das brânquias,

Tabela 5.2: Tabela referente aos factores de bioacumulação das vísceras. BDL: abaixo do limite de detecção

valor nominal de concentração	concentração ($\mu\text{g/g}$)	factor de bioacumulação - vísceras
controlo	BDL	-
10 $\mu\text{g/g}$	60 \pm 40	6
20 $\mu\text{g/g}$	30 \pm 40	1,5
40 $\mu\text{g/g}$	40 \pm 20	1
100 $\mu\text{g/g}$	200 \pm 200	2

comparou-se a concentração bioacumulada de chumbo com as concentrações nominais administradas através dos factores de bioacumulação, cujos resultados se apresentam na tabela 5.2. Tal como nas brânquias, verifica-se uma tendência decrescente de bioacumulação face à concentração nominal a que foram expostos. Apenas o grupo de 100 $\mu\text{g/g}$ apresenta um aumento mais acentuado nesta comparação, também acompanhado de uma barra de incerteza associada acentuada. Não se sabe ao certo a razão desta diferença de resultados, no entanto, pensa-se que possa estar associada à variabilidade intraespecífica dos peixes nomeadamente o sexo (estudado mais detalhadamente na secção 5.2.1.1).

Durante o bioensaio reparou-se que no fundo dos aquários existiam formações de cristais e sais, provavelmente de Pb, resultantes da precipitação deste metal. Pensa-se ainda que por este motivo, possa ter ocorrido ingestão de pequenos cristais por parte dos peixes, nomeadamente o grupo exposto a 100 $\mu\text{g/g}$, que acabariam por se alojar no intestino contribuindo para o aumento significativo da concentração de Pb nesta zona. Por essa razão e por indício de que a concentração real poderia não corresponder à nominal, realizou-se uma análise das concentrações de Pb da água por ICP-AES, cujos resultados se apresentam na secção 5.2.5.

Devido à sua elevada actividade, os tecidos das vilosidades intestinais são altamente irrigados e apresentam ferro e cobre. A presença adicional de agente xenobióticos, como o chumbo, estimula o organismo a irrigar mais essas zonas de forma a biotransformar estas substâncias [113]. O ferro e o cobre estão associados à actividade ferroxidase do sistema circulatório e dos eritrócitos e pensa-se que possam estar relacionados entre si. Para além disso têm sido investigados mecanismos associativos do ferro e do chumbo[114] como estudos apresentados por Sousa e Tavares[115], que referem a possibilidade do ferro competir com o chumbo e, consequentemente, inibir a sua ligação com a DMT1, uma proteína transportadora de metais divalentes e essencial para o processo de absorção intestinal[110]. No presente estudo, não se observaram correlações fortes para estes elementos, não corroborando a hipótese descrita, como podemos ver no gráfico da correlação da figura 5.10. Os dados referentes ao ferro e ao cobre encontram-se na tabela B.3 do apêndice B.

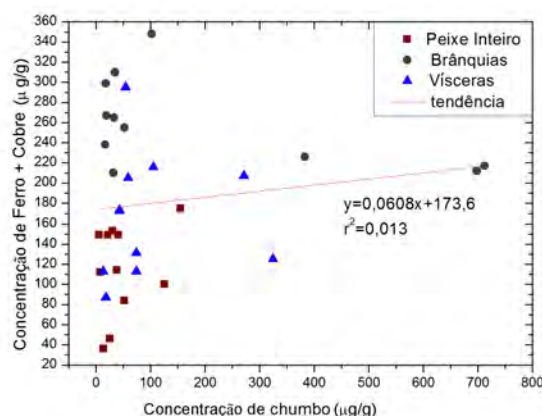


Figura 5.10: Gráfico da correlação entre o chumbo e os elementos ferro e cobre

Bioacumulação no peixe inteiro

A análise da bioacumulação do peixe inteiro, presente na figura 5.11, complementa cada uma das análises feitas anteriormente uma vez que permite ter a percepção global da bioacumulação do chumbo.

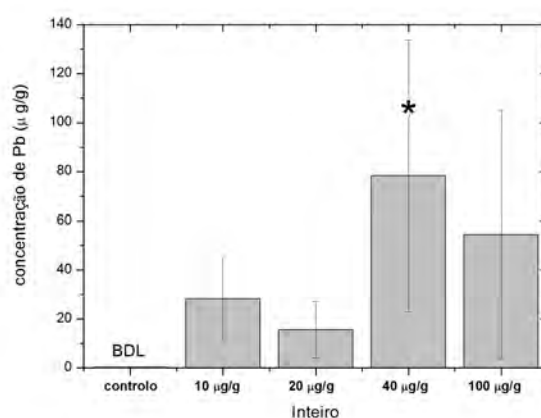


Figura 5.11: Gráfico da concentração média de Pb no peixe inteiro para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo de controle.

Sabemos que alguns tecidos alvo (espinha, cérebro e área dorsal) apresentam valores abaixo do limite de detecção da técnica, mas que não contribuem drasticamente para a bioacumulação global do chumbo nos tecidos dos *Danio rerio*. Esta análise do peixe inteiro tem em conta estas contribuições e permite comparar a bioacumulação total de cada grupo.

Quando comparado com o grupo controle, o único grupo que apresenta variações estatisticamente significativas é o exposto a $40 \mu\text{g/g}$, essencialmente devido à forte acumulação do Pb nas brânquias, como mostrado anteriormente.

Tabela 5.3: Tabela referente aos factores de bioacumulação do peixe inteiro. BDL: abaixo do limite de detecção

valor nominal de concentração	concentração ($\mu\text{g/g}$)	factor de bioacumulação - peixe inteiro
controlo	BDL	-
10 $\mu\text{g/g}$	30 \pm 20 $\mu\text{g/g}$	3
20 $\mu\text{g/g}$	20 \pm 20 $\mu\text{g/g}$	1
40 $\mu\text{g/g}$	20 \pm 20 $\mu\text{g/g}$	1/2
100 $\mu\text{g/g}$	50 \pm 60 $\mu\text{g/g}$	1/2

Verifica-se assim a tendência decrescente de bioacumulação quando é considerado o valor nominal utilizado, como é possível ver na figura 5.3. Este decréscimo pode ser explicado pela saturação de bioacumulação dos tecidos, ou seja, a partir de uma determinada dose de chumbo, os diferentes tecidos atingem o seu limite de bioacumulação, não conseguindo a partir desse valor, continuar a bioacumular [116].

À semelhança do comportamento de saturação dos tecidos em estudos, Finley *et al.* [116] estudaram a acumulação do chumbo em tecidos ósseos dos patos-reais através da espectroscopia de absorção atómica. Administraram doses de injeções de 206 mg de chumbo nos patos e constataram que os tecidos apresentavam limites de saturação do chumbo, não bioacumulando para além destes valores. Apesar de os organismos modelos serem diferentes, estes resultados podem justificar alguns dos resultados apresentados anteriormente.

Para além disso, esta tendência decrescente observada pode estar associada a outro factor, relacionado com o metabolismo. Após a exposição ao chumbo, os peixes revelaram alguns movimentos hiperativos tal como estudado por Chen *et al.* [117]. Observaram mudanças significativas na frequência do movimento da cauda e velocidade de locomoção de peixes zebras quando expostos a baixas concentrações de chumbo, referindo ainda a hiperactividade induzida em crianças intoxicadas com chumbo. Pensa-se que este aumento de metabolismo possa ajudar e acelerar o processo de excreção, contribuindo para a diminuição do valor de chumbo acumulado. Apesar de não se conhecer uma explicação para tal acontecimento e serem necessários mais estudos para se conhecer os mecanismos subjacentes, estes resultados podem justificar tal decréscimo.

A figura 5.11 sugere ainda uma conjugação entre as duas figuras anteriores (figuras 5.7 e 5.9). O valor observado pelo grupo de 40 $\mu\text{g/g}$ é obtido pela concentração acumulada nas brânquias deste grupo e o valor obtido pelo grupo de 100 $\mu\text{g/g}$ corresponde à concentração de chumbo obtida na zona visceral do mesmo. Os restantes grupos apresentam o mesmo comportamento dos tecidos alvos analisados anteriormente, concluindo-se que, de facto, os restantes tecidos alvos: espinha, dorsal e cérebro, não bioacumularam concentrações significativas de chumbo.

Este estudo não permite inferir a razão pela qual os grupos expostos a 40 $\mu\text{g/g}$ e 20 $\mu\text{g/g}$ bioacumularem mais nas brânquias e os de 10 $\mu\text{g/g}$ e 100 $\mu\text{g/g}$ nas vísceras. São

assim necessários estudos com amostragem maior para esclarecer esta situação.

5.2.1.1 Análise por sexos

As quantificações obtidas anteriormente revelaram alguns resultados com valores discrepantes. O sexo dos *Danio rerio* parece influenciar a afinidade do chumbo para com os tecidos alvo. A zona visceral destes peixes é composta pela gonádas que, por sua vez e particularmente nas fêmeas, são ricas em lípidos. O chumbo, sendo lipofílico, apresenta maior afinidade para estes tecidos, pelo que se bioacumula em maior quantidade. Por esta razão, realizou-se uma análise com base na distinção de sexos, considerando apenas as zonas das brânquias e das vísceras (atendendo que o peixe inteiro é resultado destas duas zonas).

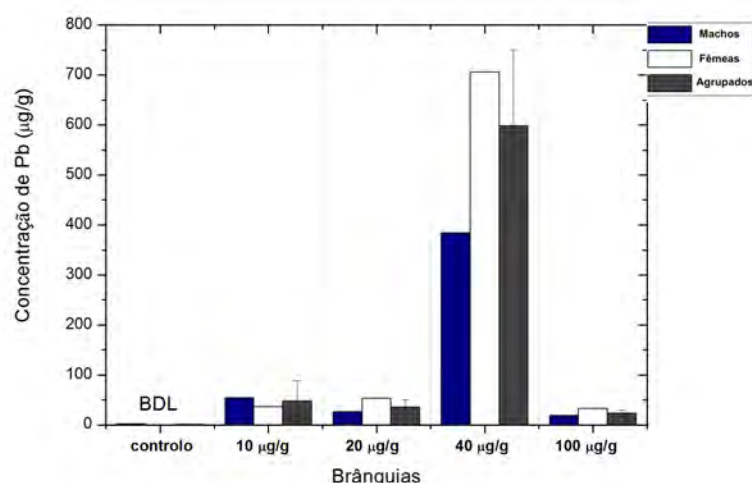


Figura 5.12: Gráfico da concentração média de Pb nas brânquias em função do sexo para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb. Os valores sem barra de erro são os referentes a um único peixe.

A figura 5.12 refere-se à deposição de chumbo branquial em função do sexo de cada peixe. As concentrações de chumbo obtidas para as exposições de 20 µg/g, 40 µg/g e 100 µg/g foram maiores nas fêmeas do que nos machos e apenas o grupo exposto a 10 µg/g apresentou maior concentração nos machos, porém, não apreciável. Apenas o grupo exposto a 40 µg/g apresenta uma diferença bastante acentuada. Apesar da estrutura branquial ser igual para os dois géneros, e à partida não se esperar diferenças consideráveis, as fêmeas são maiores e possuem diferentes metabolismos. Por esse motivo podem bioacumular mais nesta zona.

Contrariamente às brânquias, a análise por sexos da zona visceral revela diferenças significativas para todos os grupos, sendo que, em todos os casos, é o grupo de fêmeas quem apresenta maior retenção de chumbo, consequência da afinidade das gónadas para com o chumbo, maior dimensão e metabolismo das fêmeas. O grupo exposto a 100 µg/g

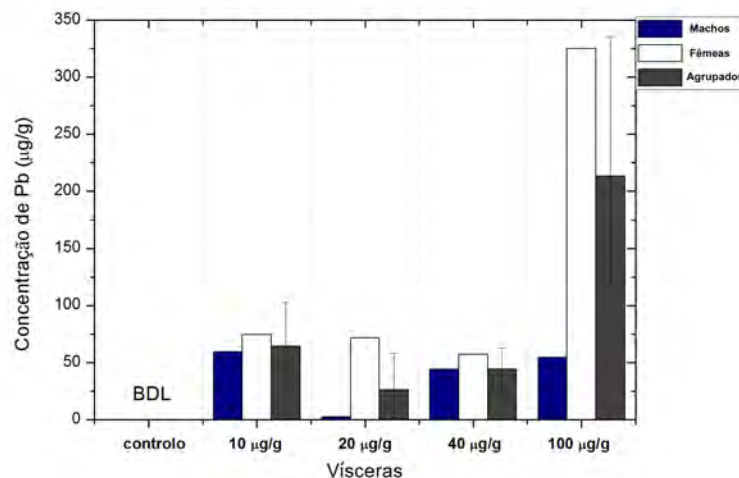


Figura 5.13: Gráfico da concentração média de Pb nas vísceras em função do sexo para cada um dos diferentes grupos expostos a Pb. Os valores sem barra de erro são os referentes a um único peixe.

apresenta uma diferença desproporcional entre fêmea/macho. No entanto, deve-se ter em conta que com uma amostragem de $n=3$, só se possui num dos casos apenas 1 macho ou 1 fêmea, pelo que a análise estatística é impossível.

Complementarmente com a análise qualitativa, verificaram-se aglomerados de chumbo nos intestinos dos peixes, que podem tanto ser cristais de chumbo (devido à precipitação), bem como uma deposição preferencial neste órgão em ambientes com alta concentração de Pb, aumentando consideravelmente a concentração do metal no órgão. Na figura 5.14 é possível verificar o mapa de um peixe exposto a $100\mu\text{g/g}$ que exemplifica o referido.

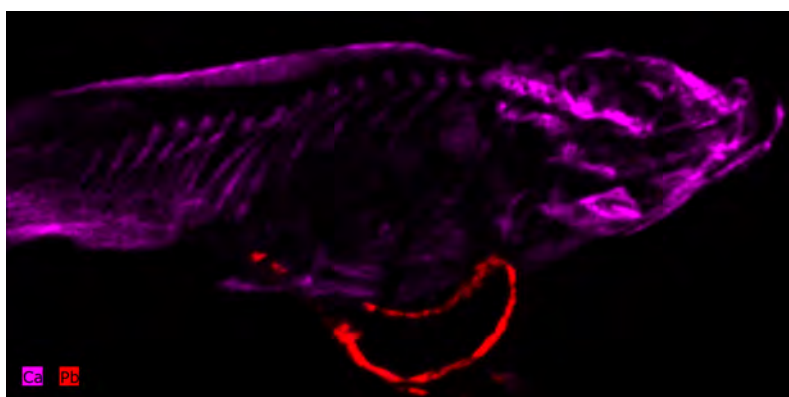


Figura 5.14: Mapa de um *Danio rerio* exposto a $100\mu\text{g/g}$ com evidência de chumbo na vísceras

É de destacar a dificuldade de realizar um corte simétrico das amostras, a variação dos tamanhos e áreas dos órgãos de peixe para peixe que resultam em barras de incerteza mais elevadas. Para além disso, deve também ter-se em conta que o trabalho em questão

utiliza organismos vivos, com variabilidade intraespecífica e ainda uma amostragem de dimensão reduzida, que influenciam os conclusões.

5.2.2 Análise por EDXRF com geometria triaxial

De seguida, as amostras foram analisadas noutra configuração da técnica de EDXRF, com geometria triaxial.

Pelo que foi observado na secção anterior, fez-se directamente uma análise tendo em conta os sexos dos peixes. O gráfico 5.15 apresenta os resultados da concentração de chumbo nos peixes zebra analisados pela técnica referida para cada um dos sexos. Pode-se constatar que existem variações substanciais nas concentrações para cada um dos sexos em todos os grupos dos bioensaios. Verifica-se uma tendência crescente para os machos (a partir do grupo exposto a 20 $\mu\text{g/g}$) à medida que se aumenta a concentração nominal utilizada. Para as fêmeas não se verifica nenhuma tendência. Porém, e com em excepção para o grupo de 100 $\mu\text{g/g}$, apresentam valores mais elevados que os respectivos machos de cada grupo. Quando apreciados estatisticamente, todos os grupos apresentam variações significativas face ao grupo de controlo. Os valores da concentração de chumbo obtidos por esta técnica encontram-se no apêndice C.

Devido à configuração desta técnica e à utilização de um colimador, a área analisada fica limitada a uma área com forma de elipse (aproximadamente 7x5mm) que, consoante o posicionamento do peixe no porta amostras, pode estar a incidir numa zona de grande concentração de Pb (como é o caso das vísceras ou brânquias) e fazer variar muito o seu valor. A área de análise é consideravelmente menor que o tamanho do slide e do peixe inteiro, pelo que esta análise não reflecte os valores de Pb no peixe todo. Os elevados valores apresentados e a observação do suporte do sistema triaxial e dos respectivos slides utilizados, sugerem que o feixe incidiu maioritariamente nas vísceras, registando assim o valor nessas zonas. A comparação entre os valores das vísceras obtidos por μ -EDXRF e os valores obtidos por esta técnica encontram-se na secção 5.2.4 e sugerem assim o referido anteriormente.

5.2.3 Análise por ICP-AES

5.2.3.1 Estudo da bioacumulação do chumbo

Depois de terem sido analisadas por EDXRF, as amostras seguiram para uma análise por ICP-AES. Do mesmo modo, distinguiram-se as amostras por sexos e por grupos. A figura 5.16 apresenta os resultados da concentração de chumbo nos peixes zebra analisados pela técnica referida para cada um dos sexos. Constata-se um aumento das concentrações presentes nos tecidos dos *Danio rerio* com o aumento das concentrações nominais a que foram expostos. Verifica-se uma ligeira diferença entre fêmeas e machos para os diferentes grupos, sendo a concentração mais elevada nas fêmeas para todos os grupos, excepto no grupo exposto a 100 $\mu\text{g/g}$. A análise estatística demonstrou variações significativas em

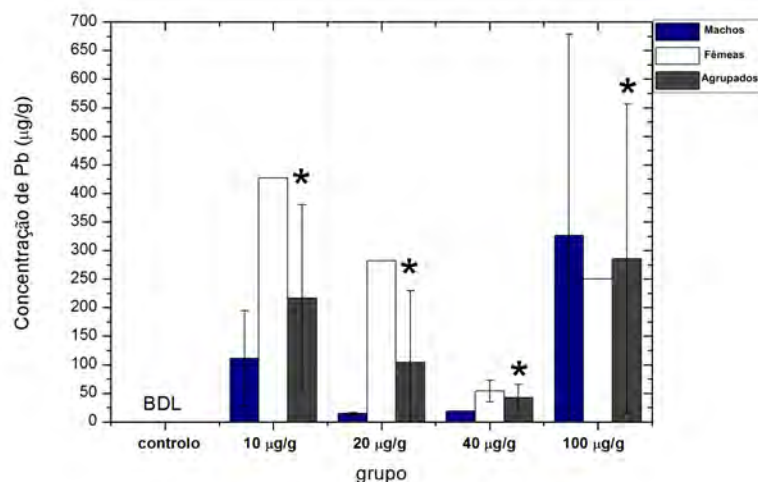


Figura 5.15: Gráfico referente à concentração média de Pb em função do sexo dos *Danio rerio* obtido através de técnica de EDXRF com geometria triaxial. Os valores sem barra de erro são os referentes a um único peixe. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p<0.05$) relativamente ao grupo de controle.

todos os grupos face ao controlo, e ainda para todos o grupos entre eles, excluindo os grupos de $10\mu\text{g/g}$ vs $20\mu\text{g/g}$. Os valores da concentração de chumbo obtidos por esta técnica encontram-se no apêndice D.

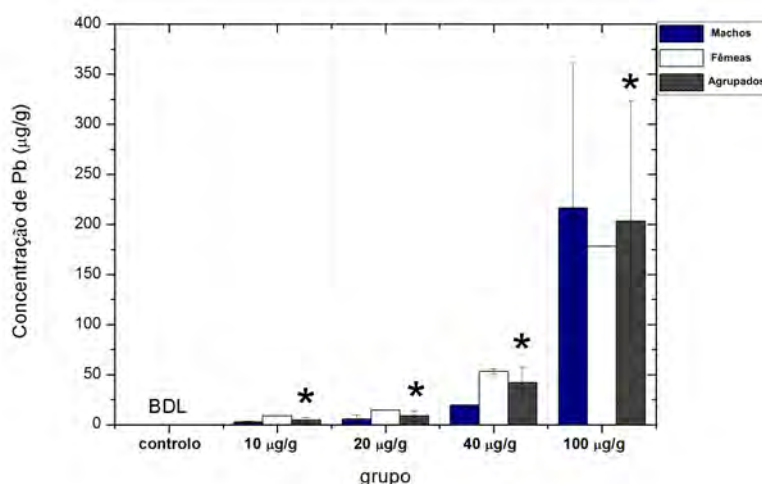


Figura 5.16: Gráfico referente à concentração elementar média de Pb em função do sexo dos *Danio rerio* obtido através de técnica de ICP-AES. Os valores sem barra de erro são os referentes a um único peixe. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p<0.05$) relativamente ao grupo de controle.

5.2.4 Comparação de técnicas

As técnicas referidas anteriormente, EDXRF e ICP-AES, analisaram as mesmas amostras expostas ao bioensaio de chumbo. Assim, através da figura 5.17, é possível examinar a comparação de resultados entre as técnicas. No geral, e dando importância às barras de incerteza, verifica-se uma concordância entre os resultados obtidos através da técnica de μ -EDXRF e ICP-AES.

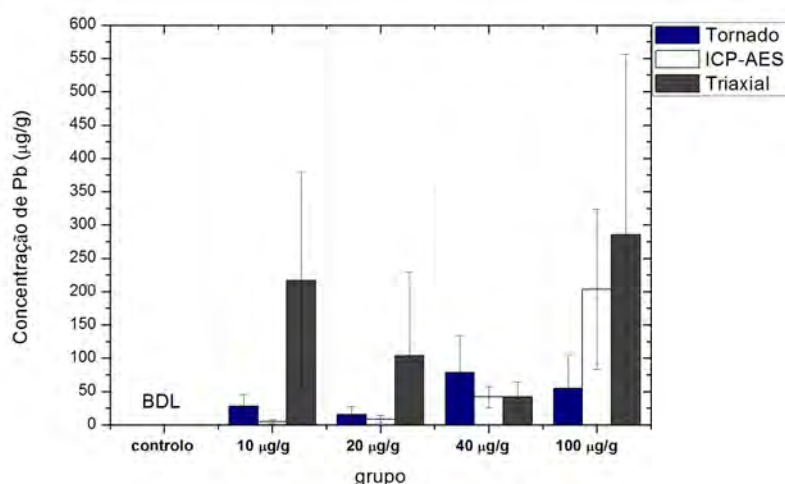


Figura 5.17: Gráfico comparativo das três técnicas utilizadas referentes à concentração elementar média de Pb.

Quando comparados os resultados obtidos através da técnica de EDXRF com geometria triaxial, os resultados diferem e apresentam barras de incerteza consideráveis. No entanto, de acordo com o referido na secção 5.2.2, esta análise parece reflectir a concentração de Pb nas vísceras dos peixes, apresentando valores bastante mais elevados e por isso diferentes quando comparados com as duas técnicas anteriores.

De forma a corroborar a hipótese colocada, comparou-se os resultados obtidos nas vísceras pela técnica de μ -EDXRF e os resultados da técnica com configuração triaxial, presente na figura 5.18. Não se considera neste gráfico os resultados do ICP-AES, já que este reflecte os resultados para o peixe inteiro. Conclui-se, por conseguinte, que ambos os resultados obtidos através desta análise se aproximam, mesmo com as devidas barras de incerteza, e pensa-se assim que a análise pela técnica de EDXRF com geometria triaxial incidiu maioritariamente na zona visceral.

5.2.5 Análise da água

Para além das amostras de peixe-zebra, foram também analisadas por ICP-AES as águas dos diferentes tanques a que os peixes estiveram expostos. Apesar das concentrações nominais estabelecidas, a análise das concentrações reais de chumbo demonstrou perdas significativas da concentração deste elemento. A biodisponibilidade do chumbo está

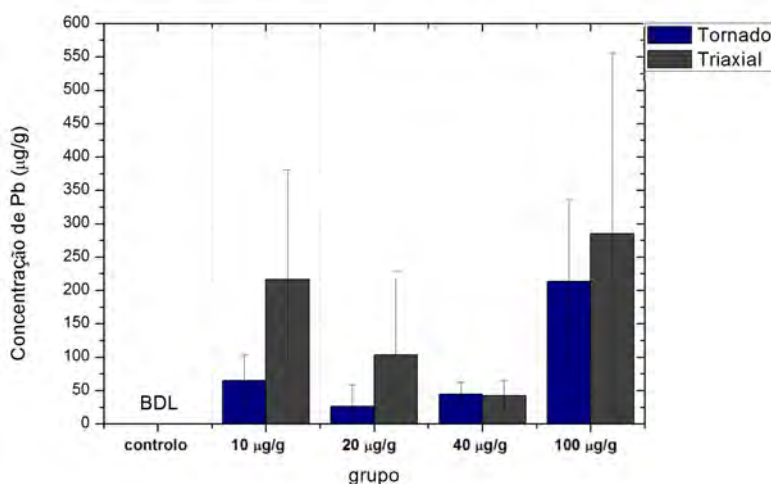


Figura 5.18: Gráfico comparativo das técnicas de EDXRF utilizadas referentes à concentração elementar média de Pb na zona visceral.

dependente da absorção de sedimentos e conteúdo natural da água, como é o caso do pH, dureza da água e alcalinidade [118]. A tabela 5.4 mostra a comparação entre as concentrações nominais e reais.

Tabela 5.4: Dados referentes à análise através de ICP-AES da concentração elementar média de Pb da água a que os peixes foram expostos nos bioensaios.

concentração nominal ($\mu\text{g/g}$)	concentração de Pb na água (mg/L)
controle	não detectado
10	$3,9 \pm 0,3$
20	$5,85 \pm 0,06$
40	$7,2 \pm 0,3$
100	$14,3 \pm 0,4$

Para a concentração nominal de $10\mu\text{g/g}$, apenas se regista uma concentração de $3,9\text{ mg/l}$ a que os peixes estiveram expostos, sendo estas duas concentrações as que mais se aproximaram. À medida que se aumenta a concentração nominal, verifica-se uma concentração real cada vez menos próxima da nominal. Estas perdas significativas podem ser justificadas por vários factores, entre eles a acumulação de Pb na matéria orgânica (e outros constituintes da água), a bioacumulação de Pb em bactérias existentes nos aquários, adsorção por metais como Fe e Mn e, por fim, precipitação do Chumbo [119].

No fundo dos aquários verificou-se a presença de sais e cristais provavelmente de Pb, resultantes da precipitação do metal, sendo esta, possivelmente, a maior causa de diminuição da concentração real de Pb disponível. Atendendo a que se utilizaram concentrações nominais muito elevadas nos diferentes tanques, seria de esperar que os valores mais elevados apresentassem maior precipitação e, conseqüentemente, valores mais discrepantes

face à concentração real de Pb.

Estima-se que, para uma concentração de $10\mu\text{g/g}$, tenham precipitado 6 mg/L , para $20\mu\text{g/g}$ à volta de 14mg/L , para $40\mu\text{g/g}$ sensivelmente 32 mg/L e por fim para $100\mu\text{g/g}$ por volta de 85mg/L . Consta-se assim que, quanto menor a concentração nominal utilizada, maior será a aproximação à concentração real de Pb.

Desta forma, tendo em conta as concentrações reais a que os peixes estiveram expostos, estes dados poderão justificar alguns dos resultados apresentados anteriormente nas secções 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3.

É de referir ainda que a bioacumulação de chumbo em organismos aquáticos pode ser afectada por variados factores, como a presença de metais, pH, dureza da água e presença de cloro. [119]. Lewis and McIntosh observaram o aumento e complexação de Pb com ferro e diminuição de pH e Weiner and Giesy mostraram que a acumulação de Pb reduziu com carbono orgânico e fosfato. No entanto, no presente estudo não foi realizado nenhum teste com a variação destes parâmetros, pelo que não sabemos ao certo como foi afectada a bioacumulação por estes factores.

Na tabela 5.5 encontram-se os valores dos factores de bioacumulação corrigidos, atendendo aos valores de concentração de Pb obtidos pela análise da água, para cada um dos órgãos e para cada grupo exposto ao Pb.

Tabela 5.5: Tabela referente aos factores de bioacumulação corrigidos.

concentração nominal	concentração ($\mu\text{g/g}$)	factor de bioacumulação	factor de bioacumulação corrigido
Brânquias			
$10\mu\text{g/g}$	50 ± 50	5	13
$20\mu\text{g/g}$	60 ± 30	3	10
$40\mu\text{g/g}$	600 ± 200	15	83
$100\mu\text{g/g}$	30 ± 10	1/3	2
Vísceras			
$10\mu\text{g/g}$	60 ± 40	6	15
$20\mu\text{g/g}$	30 ± 40	1,5	5
$40\mu\text{g/g}$	40 ± 20	1	6
$100\mu\text{g/g}$	200 ± 200	2	14
Peixe Inteiro			
$10\mu\text{g/g}$	30 ± 20	3	8
$20\mu\text{g/g}$	20 ± 20	1	3
$40\mu\text{g/g}$	20 ± 20	1/2	3
$100\mu\text{g/g}$	50 ± 60	1/2	3

Comparando os valores dos factores de bioacumulação presentes na tabela 5.5, verifica-se uma tendência semelhante, mesmo que com valores bastante superiores para os factores de bioacumulação corrigidos. Deste modo, o cálculo destes novos factores de bioacumulação revelam um comportamento semelhante ao referido na secção 5.2.1 e apesar do

valor da concentração de Pb na água ser diferente da concentração nominal, o comportamento parece manter-se.

5.2.6 Análise de Biomarcadores

Adicionalmente, realizou-se um estudo de biomarcadores com o objectivo de se avaliar o stress oxidativo causado pelo Pb.

5.2.6.1 Peroxidação Lipídica

Na figura 5.19 encontram-se os dados referentes à concentração de MDA, que representa o dano oxidativo na membrana celular. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os grupos expostos a 20 $\mu\text{g/g}$, 40 $\mu\text{g/g}$ e 100 $\mu\text{g/g}$ quando comparados com o grupo de controlo. Relativamente à comparação entre os grupos, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas apenas entre os de 10 $\mu\text{g/g}$ vs. 40 $\mu\text{g/g}$. Apesar disto, verifica-se uma tendência crescente da concentração de MDA, relativamente ao grupo de controlo. Isto porque, à partida, quanto maior a concentração de Pb, maior será o dano oxidativo e maior será a concentração de MDA. Os resultados obtidos por Shafiqur-Rehman[15] assemelham-se aos resultados obtido no presente estudos. O autor expôs carpas (*Cyprinus carpio*) a 50 μg de chumbo durante 15 e 30 dias e observou aumento dos níveis de MDA. Paralelamente, observou os níveis de MDA sob o efeito de diferentes concentrações de Pb no cérebro das mesmas carpas. A figura 5.19 revela uma tendência crescente de MDA com o aumento de Pb [15]. Também Anusuya e Kiran[120], observaram o aumento da concentração de MDA em ratos *Sprague Dawley* face ao grupo de controlo, em exposições ao chumbo de bioensaios de 4 e 8 semanas.

5.2.6.2 Superóxido Dismutase

Tal como se mostra na figura 5.20, que apresenta a percentagem de inibição da SOD para cada um dos grupos expostos ao Pb, o superóxido dismutase apresenta um comportamento crescente quando exposto a uma maior concentração de Pb. Ao encontrar agentes nocivos, o organismo sintetiza a enzima SOD de forma a neutralizar-los. Por esse motivo, em contacto com maior concentração de Pb, mais SOD será produzida. Apesar da tendência crescente verificada, apenas o grupo exposto a 100 $\mu\text{g/g}$ apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o grupo de controlo.

Tal como no presente estudo, Farombi *et al.*[16] expuseram peixes gato a 0,29 $\mu\text{g/g}$ de chumbo e concluíram que o metal induzia o aumento da concentração de SOD, com excepção nas brânquias. Também corroborando estes resultados, Vaziri *et al.*[121] reportaram uma actividade crescente de SOD nos rins, medula e outros órgãos de ratos *Dawley* expostos a chumbo.

Por outro lado, Zhang H. *et al.*[122], realizaram um estudo em fígados de peixes zebra e observaram inibição da SOD com o aumento de chumbo. Duas teorias têm sido discutidas

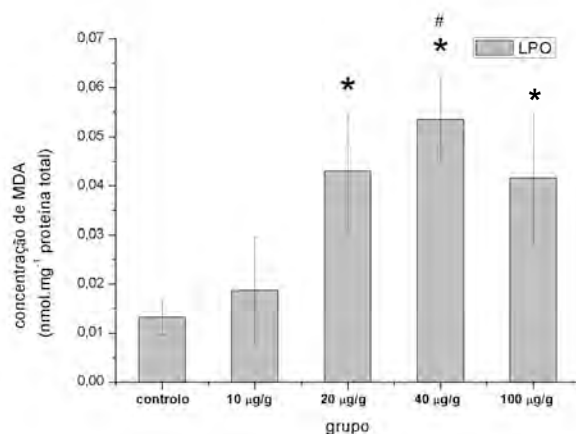


Figura 5.19: Comparação dos diferentes níveis de peroxidação lipídica causadas pelas diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controle para o *Danio rerio*. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) dos grupos expostos a 20 µg/g e 40 µg/g de Pb em relação ao grupo de controle. O cardinal indica valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) dos grupo exposto a 40 µg/g de Pb em relação ao de 10 µg/g.

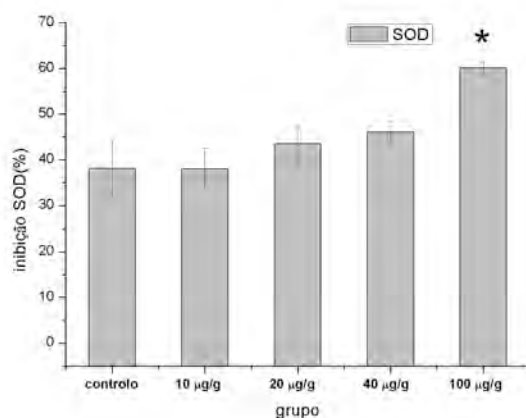


Figura 5.20: Comparação dos diferentes níveis de inibição de SOD dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controle para o *Danio rerio*. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) do grupo expostos a 100 µg/g de Pb em relação ao grupo de controle.

para justificar estes dois resultados aparentemente divergentes: a primeira diz-nos que a SOD é um mecanismo compensatório da exposição ao chumbo, e por isso, aumenta; a segunda teoria defende que os métodos de medida da enzima se baseiam na medição da alteração de substrato e que o chumbo se liga ao SOD não permitindo a ligação ao substrato nem a sua medição [122].

5.2.6.3 Catalase

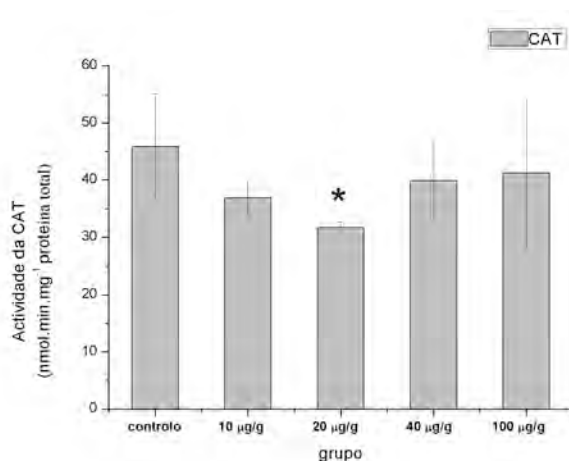


Figura 5.21: Comparação dos diferentes níveis de actividade da Catalase dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o *Danio rerio*. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) do grupo expostos a 20 µg/g de Pb em relação ao grupo de controlo.

A figura 5.21 apresenta a actividade da CAT em função dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb. A actividade da CAT apresenta diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controlo e o grupo exposto a 20 µg/g. Analisando a figura, sugere-se que existe uma tendência para a diminuição da actividade da catalase até aos 20 µg/g, não sendo possível concluir acerca da actividade da CAT para as concentrações superiores a este.

Contrariamente aos resultados obtidos neste estudo, Boudjema k. *et al.* [123] observaram que a actividade da catalase aumentava face a uma maior concentração de chumbo. Estudaram a actividade de catalase em mexilhões expostos a diferentes metais, inclusive o chumbo. Contudo quer o modelo biológico utilizado quer as condições experimentais, como a concentração utilizada, baixo pH e baixa temperatura, eram distintas do presente estudo o que torna qualquer tentativa de comparação difícil.

De igual modo, também Ahmed T. *et al.* [42] observaram um comportamento de aumento semelhante nos rins dos peixes *Oreochromis niloticus* quando expostos a chumbo e cádmio durante a primeira semana. No entanto, na segunda semana de estudo, observaram uma mudança de comportamento da actividade da catalase, semelhante ao que se observou no presente estudo. Para além disso, a diminuição da actividade desta enzima

poderá ter efeitos ao nível da peroxidação lipídica, devido à produção excessiva de H_2O_2 . Também o estudo apresentado por Dimitrova *et al.*[124] em carpas, revelou diminuição da actividade de CAT após 5 dias de exposição a chumbo e zinco, corroborando os resultados obtidos para os grupos expostos até aos 20 μ g/g.

5.2.6.4 HSP70

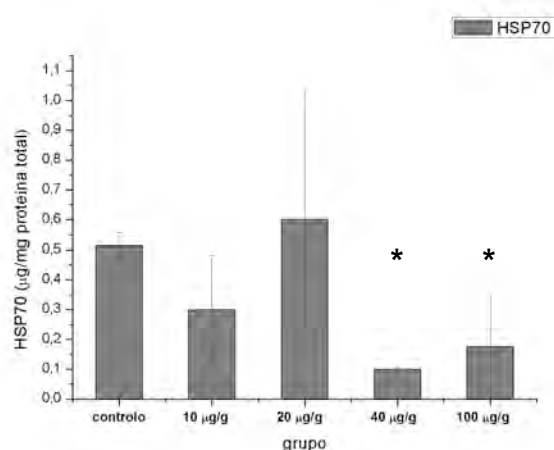


Figura 5.22: Comparação da quantidade de proteína HSP70 dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o *Danio rerio*.

Utilizou-se também a HSP70, uma proteína de choque térmico, para estudar os danos provocados pelo chumbo. A análise da figura 5.22 revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas para os grupos expostos a 40 μ g/g e 100 μ g/g, comparativamente com os controlos e parece existir uma tendência decrescente em relação ao controlo. Os resultados sugerem que as concentrações mais elevadas de Pb inibem a produção de HSP70.

Também Nadeau *et al.*[125], Opanashuk *et al.*[44] e ainda Cabell *et al.*[126] constatarem uma tendência decrescente destas proteínas quando expostas ao Pb em invertebrados e células neuronais/astrocitos, sugerindo que possam existir mecanismos de adaptação, tolerância e resistência face ao stress induzido por estas substâncias. Efremova *et al.*[127] testaram o efeito do Pb nas HSP70 em douradas, não tendo verificado um aumento e obtendo resultados similares aos do presente estudo.

Ainda noutra vertente, Posser *et al.*[128] recorreram a ratos *Wistar*, contaminando-os com Pb, não tendo conseguido verificar alterações significativas ou padrões da proteína de stress em questão.

Por outro lado, contrariamente aos resultados obtidos no presente trabalho, diversos estudos como o de Wu *et al.* [129], Fulladosa *et al.*[130] e Singer *et al.* [131], mostraram um aumento da produção de HSP70. Contudo, é possível que animais distintos dos utilizados no presente estudo (mexilhões e Douradas) bem como diferentes condições experimentais

(cloreto de chumbo, horas de exposição, temperatura e pH) tenham produzido resultados distintos, tornando difícil uma comparação.

5.2.6.5 Glutathione Peroxidase

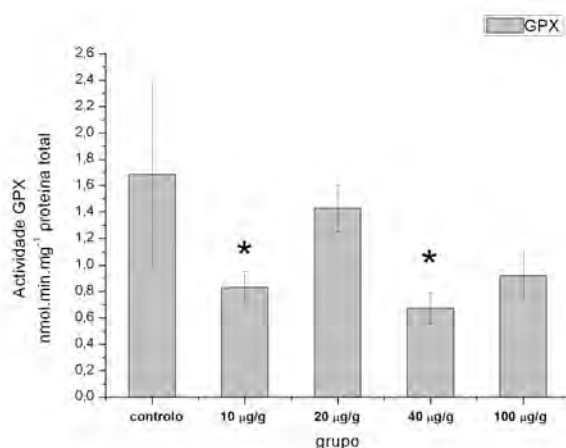


Figura 5.23: Comparação dos diferentes níveis de actividade da GPx dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o *Danio rerio*. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) dos grupos expostos a 10 µg/g e 40 µg/g de Pb em relação ao grupo de controlo.

No gráfico 5.23 encontram-se os dados referentes à Glutathione peroxidase (GPx). Existem diferenças estatisticamente significativas para os grupos de 10 µg/g e 40 µg/g comparativamente ao grupo de controlo, revelando uma tendência decrescente de actividade da GPx. Tal como no presente estudo, o bioensaio realizado por Labrot *et al.* [132] em peixes zebra, demonstrou que a actividade da GPx diminui em função do aumento da concentração de chumbo. Ariza *et al.* [133] verificaram também um ligeira inibição da actividade de GPx após exposição ao chumbo de uma cultura de células AS52 assim como Rajat e Gill [134] em ratos *Wistar* expostos a 50 µg/g de Pb. Nestes casos, a actividade enzimática é obtida medindo o consumo de β -NADPH como reagente, numa reacção secundária catalisada pela glutathione redutase. Com o aumento da concentração de chumbo no organismo, aumenta a peroxidação lipídica e, consequentemente, a produção de peróxido de hidrogénio, sendo a Glutathione S-transferase (GST) necessária para catalisar a sua redução, e resultar na sua diminuição [46].

5.2.6.6 Acetilcolinesterase

Por fim, utilizou-se também a acetilcolinesterase para medição do efeito do chumbo no organismo dos *Danio rerio*. Os resultados referentes a esta enzima encontram-se na figura 5.24. Apesar do estudo estatístico não ter mostrado a existência de diferenças significativas, parece existir uma tendência crescente da actividade da AchE quando comparado com o grupo controlo. Com grande afinidade para o chumbo e ligando-se a ela, o metal

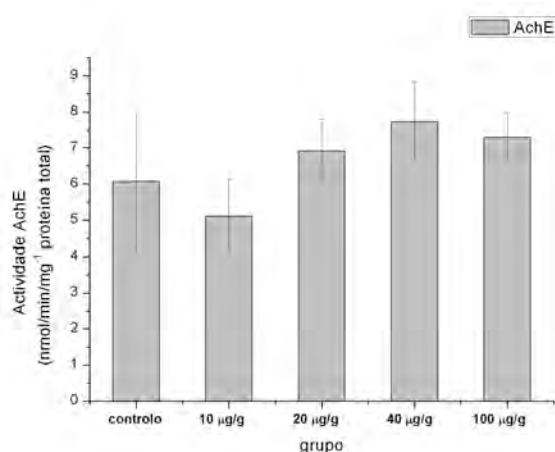


Figura 5.24: Comparação dos diferentes níveis de actividade da AchE dos grupos expostos a diferentes concentrações de Pb comparativamente ao grupo de controlo para o *Danio rerio*.

inibe a acção da AchE. No entanto, os resultados obtidos sugerem não existir uma inibição enzimática evidente. Também Richetti *et al.* [47] analisaram o efeito de diferentes metais no cérebro dos peixes zebra. Expuseram *Danio rerio* a 20 µg/l de chumbo durante diferentes periodos (24h, 96h e 30 dias). Face ao grupo de controlo, obtiveram uma redução de actividade nas primeiras 24 horas, seguido de um restauro da actividade crescente de AchE nos periodos seguintes. Segundo os autores, estes resultados sugerem algum mecanismo indirecto do organismo e da enzima, que necessitará de mais estudos. Paralelamente, o grupo realizou também um estudo do efeito do aumento Pb na actividade de AchE, não obtendo diferenças significativas muito acentuadas mas uma tendência crescente da actividade da enzima. Para além disso, é preciso considerar que a análise da AchE foi realizado no homogeneizado do organismo inteiro o que poderá mascarar algum efeito mais específico que possa ocorrer ao nível do cérebro. Sugerindo-se que em estudos posteriores, se realize um estudo individualizado por órgãos para este biomarcador.

CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

6.1 Conclusão e trabalhos futuros

O principal objectivo deste estudo foi avaliar o efeito da toxicidade do chumbo, e outros elementos traço, em peixes zebra (*Danio rerio*). Para tal, recorreu-se a três técnicas de detecção multielementar.

Através da μ -EDXRF foi possível estudar-se a distribuição elementar global e simultânea nos diversos órgãos de *Danio rerio*, complementado os estudos de outros investigadores já realizados em apenas um ou vários grupos de órgãos. A análise através deste método permitiu definir os diferentes tecidos-alvo preferenciais da bioacumulação do chumbo assim como obter mapas qualitativos dos mesmos. Percebeu-se que o chumbo apresenta maior afinidade com órgãos como as brânquias e vísceras e que devido à alta afinidade que possui para com os lípidos se deposita em maior quantidade nas fêmeas, corroborando a informação encontrada na literatura.

Analysaram-se ainda as amostras pela técnica de ICP-AES e EDXRF com geometria triaxial, sendo apenas possível a comparação das três técnicas para o peixe todo. Obteve-se assim concordância entre os resultados da μ -EDXRF e ICP-AES e concluiu-se que os valores obtidos pelo método triaxial diziam respeito maioritariamente à zona visceral.

Paralelamente, investigou-se o efeito do chumbo a nível celular através do estudo enzimático e de HSP70. A LPO foi a que apresentou variações significativas mais acentuadas, reflectindo o dano celular causado pelo chumbo nos grupos expostos a concentrações mais elevadas. Quanto às outras enzimas, estas revelaram algumas tendências e diferenças significativas face ao controlo, sendo apenas possível fazer suposições acerca dos danos causados a nível celular. Alguns dos resultados enzimáticos e mais especificamente a AchE, podem apresentar efeitos mascarados devido ao método utilizado, sugerindo-se que no futuro se realize um estudo mais individualizado por órgãos para este biomarcador.

Por se tratarem de organismos vivos, todos os resultados apresentados partilham de barras de incerteza associadas, que reflectem fortemente a variabilidade intrínseca de cada peixe. O sexo, tamanho, condição fisiológica e informação genética variam de animal para animal, sendo a resposta ao chumbo diferente para cada um deles. As barras de incerteza podem também ser superiores devido ao número reduzido de amostras do bioensaio.

No contexto dos resultados obtidos, propõe-se para um estudo futuro a utilização de pastilhas na análise de EDXRF com geometria triaxial. A homogenização da amostra poderá permitir uma quantificação do peixe como um todo para evitar possíveis discrepâncias. Com o mesmo objectivo, sugere-se também aumentar o número de amostras utilizadas.

De forma a otimizar os bioensaios de Pb, seria vantajoso realizar-se um bioensaio com vista a determinação do valor de Concentração letal (LC50) do chumbo para o *D. rerio*, já que não foi possível encontrar um valor coerente na literatura, talvez devido ao efeito de precipitação do Pb na água.

Em suma, apesar de ser um estudo relativamente curto, verificou-se que o chumbo induziu efeitos tóxicos tanto a nível celular como de bioacumulação nos organismos do peixe zebra. Além disso, os resultados obtidos e as respectivas comparações demonstraram que as técnicas não destrutivas utilizadas são adequadas para a avaliação quantitativa de amostras biológicas, sendo, no entanto, necessária uma melhoria substancial de técnica de modo a detectar a presença deste metal no cérebro, osso e músculo do *Danio rerio*.

BIBLIOGRAFIA

- [1] World Health Organization (WHO). *Volume 87 Inorganic and Organic Lead Compounds*. Rel. téc. 2006, pp. 1–16.
- [2] B. Carson, H. Elis III e J. McCann. *Toxicology and biological monitoring of metals in humans*. 1st. Lewis Publisher, 1986, p. 112. ISBN: 0-87371-072-X.
- [3] A. J. Hill, H. Teraoka, W. Heideman e R. E. Peterson. “Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity”. Em: *Toxicological Sciences* 86.1 (2005), pp. 6–19. ISSN: 10966080. DOI: [10.1093/toxsci/kfi110](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110).
- [4] P. McGrath e C. Q. Li. “Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity”. Em: *Drug Discovery Today* 13.9-10 (2008), pp. 394–401. ISSN: 13596446. DOI: [10.1016/j.drudis.2008.03.002](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.03.002).
- [5] B. Wu e J. S. Becker. *Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range*. 2011. DOI: [10.1016/j.ijms.2011.01.019](https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.01.019). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2011.01.019>.
- [6] H. Gunzler e A. Williams. *Handbook of analytical techniques*. 2nd. Weinheim, DE: Wiley-VCH, 2002, pp. 753–765. ISBN: 3-527-30165-8.
- [7] M. West, A. T. Ellis, P. Potts, C. Streli, C. Vanhoof, D. Wegrzynek e P. Wobrauschek. “Atomic spectrometry update–X-ray fluorescence spectrometry”. Em: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012), pp. 1603–1644. ISSN: 0267-9477. DOI: [10.1039/c2ja90045a](https://doi.org/10.1039/c2ja90045a).
- [8] T. Magalhães, A. von Bohlen, M. L. Carvalho e M. Becker. “Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF”. Em: *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 61.10-11 SPEC. ISS. (2006), pp. 1185–1193. ISSN: 05848547. DOI: [10.1016/j.sab.2006.06.002](https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.06.002).
- [9] D. Guimarães, J. P. Santos, M. L. Carvalho, M. S. Diniz, B. House e V. M. Miller. “Analytical evidence of heterogeneous lead accumulation in the hypothalamic defence area and nucleus tractus solitarius”. Em: *NeuroToxicology* 44 (2014), pp. 91–97. ISSN: 18729711. DOI: [10.1016/j.neuro.2014.05.010](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.05.010).

- [10] F. Bilo, S. Moscoso, L. Borgese, M. V. Delbarba, A. Zacco, A. Bosio, S. Federici, M. Guarienti, M. Presta, E. Bontempi e L. E. Depero. "Total reflection X-Ray fluorescence spectroscopy to study Pb and Zn accumulation in zebrafish embryos". Em: *X-Ray Spectrometry* 44.3 (2015), pp. 124–128. ISSN: 10974539. DOI: [10.1002/xrs.2588](https://doi.org/10.1002/xrs.2588).
- [11] P. J. Custódio, M. L. Carvalho, F. Nunes, S. Pedroso e A. Campos. "Direct analysis of human blood (mothers and newborns) by energy dispersive X-ray fluorescence." Em: *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 19.2-3 (2005), pp. 151–8. ISSN: 0946-672X. DOI: [10.1016/j.jtemb.2005.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.09.002). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325530>.
- [12] N. Ayed. "Determination of P, Ca, Zn, Cd and Pb concentrations in muscle, gills, liver, gonads and skeletons of two natural populations of *Atherina lagunae* in North Tunis Lake, Tunisia". Em: *Journal of Water Resource and Protection* 03.06 (2011), pp. 421–428. ISSN: 1945-3094. DOI: [10.4236/jwarp.2011.36052](https://doi.org/10.4236/jwarp.2011.36052). URL: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jwarp.2011.36052>.
- [13] M. Takamiya, F. Xu, H. Suhonen, V. Gourain, L. Yang, N. Y. Ho, L. Helfen, A. Schröck, C. Etard, C. Grabher, S. Rastegar, G. Schlunck, T. Reinhard, T. Baumbach e U. Strähle. "Melanosomes in pigmented epithelia maintain eye lens transparency during zebrafish embryonic development". Em: *Scientific Reports* 6.October 2015 (2016), p. 25046. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep25046](https://doi.org/10.1038/srep25046). URL: <http://dx.doi.org/10.1038/srep25046><http://www.nature.com/articles/srep25046>.
- [14] J. Lee e J. L. Freeman. "Zebrafish as a Model for Developmental Neurotoxicity Assessment: The Application of the Zebrafish in Defining the Effects of Arsenic, Methylmercury, or Lead on Early Neurodevelopment". Em: *Toxics* (2014), pp. 464–495. DOI: [10.3390/toxics2030464](https://doi.org/10.3390/toxics2030464).
- [15] U. Rehman. "Lead-Exposed Increase in Movement Behavior and Brain Lipid Peroxidation in Fish". Em: *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering* A38.October 2014 (2007), pp. 37–41. DOI: [10.1081/ESE-120016928](https://doi.org/10.1081/ESE-120016928).
- [16] E. O. Farombi, O. A. Adelowo e Y. R. Ajimoko. "Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River". Em: *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4.2 (2007), pp. 158–165. ISSN: 16604601. DOI: [10.3390/ijerph2007040011](https://doi.org/10.3390/ijerph2007040011).
- [17] F. R. Moreira e J. C. Moreira. "A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde". Em: *Ciência & Saúde Coletiva* 9.1 (2004), pp. 167–181. ISSN: 1413-8123. DOI: [10.1590/S1413-81232004000100017](https://doi.org/10.1590/S1413-81232004000100017).

- [18] O. Thomas Jefferson National Accelerator Facility. *The Element Lead- Thomas Jefferson National Accelerator Facility - Office of Science Education*. URL: <http://education.jlab.org/itselemental/ele082.html> (acedido em 03/04/2017).
- [19] N. M. Roy, S. DeWolf e B. Carneiro. "Evaluation of the developmental toxicity of lead in the Danio rerio body". Em: *Aquatic Toxicology* 158 (2015), pp. 138–148. ISSN: 18791514. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.10.026. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.026>.
- [20] M. A. Assi, M. Noor, M. Hezmee, A. W. Haron, M. Yusof e M. Sabri. "The detrimental effects of lead on human and animal health". Em: *Veterinary World* 9 (2016), pp. 660–671. DOI: 10.14202/vetworld.2016.660-671. URL: www.veterinaryworld.org/Vol.9/June-2016/20.pdf {\%}OAREVIEW.
- [21] K. Chibowska, I. Baranowska-bosiacka, A. Falkowska, I. Gutowska, M. Goschorska e D. Chlubek. "Effect of Lead (Pb) on Inflammatory Processes in the Brain". Em: *International Journal of Molecular Sciences* (2016). DOI: 10.3390/ijms17122140.
- [22] M. Ho Yu. *Enviromental Toxicology-Biological and Health Effects of Pollutants*. 2nd. USA: CRC Press, 2004, pp. 186–193. ISBN: 1-56670-670-x.
- [23] Helmut-Fischer. *Periodic-table of the Elements, x-ray properties*.
- [24] NIST. *Basic Atomic Spectroscopy Data*. URL: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/leadtable1.htm> (acedido em 10/01/2017).
- [25] National Toxicology Services Program Department of Health and Human. *Report on Carcinogens-Lead and Lead Compounds, 14th edition*. Rel. téc. National Toxicology Services Program, Department of Health e Human, 2004.
- [26] M. Carvalho. "Fluorescência de raios-X aplicada ao estudo de ossadas humanas". Tese de Mestrado. Tese de Mestrado, FCT-UNL, 2015.
- [27] T. D. S. Schifer, S. B. Junior e M. A. E. Montano. "Aspectos toxicológicos do chumbo". Em: *Informa* 17.5/6 (2005), pp. 67–72.
- [28] C. D. Klaaseen. *Casarett and Doull's toxicology- the Basic Science of Poisons*. 7th. USA: McGraw-Hill, 2008, pp. 943–946. ISBN: 978-0-07-147051-3.
- [29] H Abadin, A. A, S. YW e E. Al. "3 . Health Effects". Em: *Toxicological profile for lead*. Atlanta: Agency for Toxic Substances e Disease Registry (US), 2007. Cap. 3th, pp. 1 –242. ISBN: 7440-38-2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/286524>. arXiv: arXiv: 1011.1669v3. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158766/>.
- [30] F. R. Moreira e J. C. Moreira. "Os efeitos do chumbo sobre o Organismo humano e seu significado para a saúde". Em: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 181.2 (2013), pp. 226–32. ISSN: 1873-6424. DOI: 10.1590/S1020-49892004000200007. URL: <http://www.scielo.org/pdf/rpsp/v15n2/20821.pdf>.

- [31] G. Flora, D. Gupta e A. Tiwari. "Toxicity of lead: a review with recent updates". Em: *Interdisciplinary Toxicology* 5.2 (2012), pp. 47–58. ISSN: 1337-9569. DOI: 10.2478/v10102-012-0009-2. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3485653&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [32] I. C.F. R. Ferreira e R. M. V. Abreu. "Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos". Em: *Bioanálise* 2 (2007), pp. 32–39. URL: https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2711/1/Publica{\c{c}}{\~{a}}o{_}Nacional{_}Sressoxidativo.pdf.
- [33] M. Szymanski. "Molecular mechanisms of lead toxicity". Em: *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 95.2 (2014), pp. 137–149. ISSN: 08607796. URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84922809798&partnerID=tZ0tx3y1>.
- [34] K. Chris. *Basics of Toxicology*. 1st. Idaho State: Wiley & Sons, 1998, pp. 200–202. ISBN: 978-0-471-29982-0.
- [35] R. C. Gupta. *Biomarkers in Toxicology*. Oxford: Elviesier, 2014, pp. 3–5. ISBN: 9780124046306. DOI: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00001-4. URL: <http://www.sciencedhttp/dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00001-4direct.com/science/article/pii/B9780124046306000014http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124046306000014>.
- [36] P. a. Lopes, P. a. Lopes, T. Pinheiro, T. Pinheiro, M. C. Santos, M. C. Santos, M. Joao, M. Joao, A. M. Viegas-crespo e A. M. Viegas-crespo. "Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations to inorganic pollutants exposure". Em: *The science of the total environment* (2001), pp. 153–163.
- [37] E Niki. "Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers". Em: *Biofactors* 34.2 (2008), pp. 171–180. ISSN: 09516433 (ISSN).
- [38] A. Ayala, M. F. Muñoz e S. Argüelles. "Review Article Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal". Em: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014 (2014).
- [39] J. McCord e I. Fridovich. *Superoxide Dismutase- an enzymic function for erythrocyuprein*. 1969. URL: <http://www.jbc.org/content/244/22/6049> (acedido em 02/07/2017).
- [40] G. Aldini, K. J. Yeum, E. Niki e R. M. Russell. *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications*. 2010. ISBN: 9780813815350. DOI: 10.1002/9780813814438.

- [41] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum e O. Kalayci. "Oxidative stress and antioxidant defense." Em: *The World Allergy Organization journal* 5.1 (2012), pp. 9–19. ISSN: 1939-4551. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613. URL: <http://www.waojournal.org/content/5/1/9>.
- [42] F. Fish, T. Ahmed, S. Abdullah, K. Abbas e M. A. Zia. "Catalase Enzyme Response to Chronic Pb + Cd Metal Mixture Exposure , Its Purification and Partial Characterization from the Kidney of". Em: *Pakistan j. Zool.* 48.6 (2016), pp. 1733–1740.
- [43] J. Matés, C. Perez-Gómez e I. Núñez de Castro. "Antioxidant Enzymes and Human Diseases". Em: *Chinical Biomechemistry* 32.8 (1999), pp. 595–603.
- [44] L. A. Opanashuk e J. N. Finkelstein. "Relationship of Lead-Induced Proteins to Stress Response Proteins in Astroglial Cells". Em: *Neuroscience Research* 632 (1995), pp. 623–632.
- [45] M. P. Mayer e B Bukau. "Review Hsp70 chaperones : Cellular functions and molecular mechanism". Em: *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (2005), pp. 670–684. DOI: 10.1007/s00018-004-4464-6.
- [46] F. Villamena. *Molecular basis of oxidative stress*. Canada: Wiley, 2013, p. 214. ISBN: 9780470572184.
- [47] S. K. Richetti, D. B. Rosemberg, J. Ventura-Lima, J. M. Monserrat, M. R. Bogo e C. D. Bonan. "Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure". Em: *NeuroToxicology* 32.1 (2011), pp. 116–122. ISSN: 0161813X. DOI: 10.1016/j.neuro.2010.11.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.001>.
- [48] S. Santos. "Estudos de actividade inibidora de acetilcolinesterase e actividade antioxidante por derivados de colina de ácidos cafeico, cinâmico e rosmarínico. metabolismo in vitro destes compostos." Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências- Universidade de Lisboa, 2009.
- [49] P. Blain. "Organophosphorus Poisoning (acute)". Em: *ClinicalEvidence* (2017). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3217786/>.
- [50] S. Silva. "Intoxicações por inibidores da acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento". Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina- Universidade de Coimbra, 2015.
- [51] A. Baily, M. Medeiros, P. Di Mascio e E. Almeida. "In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the Perna perna mussel's digestive gland". Em: *Biotemas* 19.1 (2006), pp. 35–39. URL: http://www.researchgate.net/publication/26428145_In_vivo_effects_of_metals_on_the_acetylcholinesterase_activity_of_the_Perna_perna_mussel's_digestive_gland

- }perna{_}mussels{_}digestive{_}gland / file / 50463516be1a5489b2 . pdf.
- [52] L Martinez-Tabche, M. D. Ortega, B Ramirez Mora, C German Faz, E Lopez Lopez e M Galar Martinez. "Hemoglobin concentration and acetylcholinesterase activity of oligochaetes in relation to lead concentration in spiked sediments from Ignacio Ramirez reservoir." Em: *Ecotoxicology and environmental safety* 49.1 (2001), pp. 76–83. ISSN: 0147-6513. DOI: [10.1006/eesa.2001.2030](https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2030). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651301920305>.
- [53] E. P. Rico, D. B. Rosemberg, M. R. Senger, M. de Bem Arizi, G. F. Bernardi, R. D. Dias, M. R. Bogo e C. D. Bonan. "Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain". Em: *Neurotoxicology and Teratology* 28.4 (2006), pp. 489–496. ISSN: 08920362. DOI: [10.1016/j.ntt.2006.05.001](https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.05.001).
- [54] U. of Washington. *Pesticides poisoning- Pediatric Environmental Health Specialty*. URL: <http://depts.washington.edu/opchild/acute.html> (acedido em 25/06/2017).
- [55] M. Ariza, G. Bijur e M. Williams. *Environmental metal pollutants, reactive oxygen intermediates and genotoxicity*. 1999.
- [56] C. H. Hsu, Z. H. Wen, C. S. Lin e C. Chakraborty. "The zebrafish model: use in studying cellular mechanisms for a spectrum of clinical disease entities". Em: *Curr Neurovasc Res* 4.2 (2007), pp. 111–120. ISSN: 1567-2026. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/156720207780637234>. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{&}uids=17504209>.
- [57] Danny Markowski. *Danio rerio*. URL: http://animaldiversity.org/accounts/Danio{_}rerio/ (acedido em 16/01/2017).
- [58] N. G. Holtzman, M. Kathryn Iovine, J. O. Liang e J. Morris. "Learning to fish with genetics: A primer on the vertebrate model *Danio rerio*". Em: *Genetics* 203.3 (2016), pp. 1069–1089. ISSN: 19432631. DOI: [10.1534/genetics.116.190843](https://doi.org/10.1534/genetics.116.190843).
- [59] M. Dubinska-Magiera, M. Daczewska, A. Lewicka, M. Migocka-Patrzalek, J. Niedbalska-Tarnowska e K. Jagl. "Zebrafish: A model for the study of toxicants affecting muscle development and function". Em: *International Journal of Molecular Sciences* 17.11 (2016). ISSN: 14220067. DOI: [10.3390/ijms17111941](https://doi.org/10.3390/ijms17111941).
- [60] M. Cristina e B. Sant. "Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida ferro". Tese de Mestrado. Tese de Mestrado, Faculdade de Biociências da Universidade Católica do Rio grande do Sul, 2009, pp. 1–58.

-
- [61] L. Ribas e F. Piferrer. "The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research". Em: *Reviews in Aquaculture* 6.4 (2014), pp. 209–240. ISSN: 17535131. DOI: [10.1111/raq.12041](https://doi.org/10.1111/raq.12041).
 - [62] B. Reed e M. Jennings. *Guidance on the housing and care of zebrafish Danio rerio*. West Sussex, England, 2010.
 - [63] R. White, K. Rose e L. Zon. "Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward." Em: *Nature reviews. Cancer* 13.9 (2013), pp. 624–36. ISSN: 1474-1768. DOI: [10.1038/nrc3589](https://doi.org/10.1038/nrc3589). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969693>.
 - [64] T. Gupta e M. C. Mullins. "Dissection of organs from the adult zebrafish." Em: *Journal of visualized experiments : JoVE* 37 (2010), pp. 4–8. ISSN: 1940-087X. DOI: [10.3791/1717](https://doi.org/10.3791/1717).
 - [65] ZIRC. *Zebrafish International Research Center (ZIRC)*. URL: <https://zebrafish.org/health/index.php> (acedido em 21/08/2017).
 - [66] A. L. Menke, J. M. Spitsbergen, A. P. M. Wolterbeek e R. a. Woutersen. "Normal anatomy and histology of the adult zebrafish." Em: *Toxicologic pathology* 39.5 (2011), pp. 759–775. ISSN: 1533-1601. DOI: [10.1177/0192623311409597](https://doi.org/10.1177/0192623311409597).
 - [67] R. Grieken e A. Maekowicz. *Handbook of x-ray spectrometry*. 2nd. new york: CRC Press, 2002. ISBN: 0-8247-0600-5.
 - [68] P Brouwer. *Theory of XRF*. 2010.
 - [69] R. Jenkins. *x-ray flourescence spectrometry*. 2nd. New York: John Wiley & Sons, 1999. ISBN: 0-471-29942-1.
 - [70] D. Guimarães. "Measurement of Lead Concentration in Biological Tissues by Atomic Spectroscopy Techniques". Doctor of philosophy degree. Doctor of philosophy degree, FCT-UNL, 2011.
 - [71] B. A. Dr. Reinhold Schlotz, freelance writer and applications scientist e B. A. Dr. Stefan Uhlig, International Sales Manager. *Introduction to X-ray Fluorescence (XRF)*. 2006.
 - [72] M Guerra, M Manso, S Pessanha, A. Le Gac, S Longelin, A. Guilherme, M. Gil, A. Seruya e M. Carvalho. "X-Ray Fluorescence Spectrometry as a Diagnostic Tool in Characterization and Conservation of Manueline-Illuminated Manuscripts". Em: *Cultural Heritage: Protection, Developments and International Perspectives*. Lisboa, 2013, pp. 235–255.
 - [73] E. Okuno. "Efeitos biológicos das radiações ionizantes. acidente radiológico de Goiânia". Em: *Estudos Avançados* 27.77 (2013), pp. 185–200.
 - [74] L. Goncalez e T. Wess. "Use of attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy to measure collagen degradation in historical parchmentm". Em: *Society of applied spectroscopy applied spe* (2008). DOI: [10.1366/000370208786049196](https://doi.org/10.1366/000370208786049196).

- [75] E. L. Alpen. *Radiation Biophysics*. 2nd. San Diego: Academic Press, 1998, pp. 50–76. ISBN: 0-12-053085-6.
- [76] K. Janssens. *Section V Methods 4: Elemental Analysis*. 1st. Weinheim, DE: Wiley-VCH, 2003, pp. 366–420. ISBN: 3527297820. DOI: [10.1021/ja033666c](https://doi.org/10.1021/ja033666c).
- [77] B. Nano. *M4 tornado- High Performance Micro-XRF spectrometer*.
- [78] Bruker. *M4 Tornado - polycapillary*. URL: <https://www.bruker.com/pt/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/m4-tornado/technical-details/spot-size.html> (acedido em 30/01/2017).
- [79] C. X-ray optical systems. *Micro X-ray fluorescence (μ XRF)*. URL: <http://www.xos.com/Micro-XRF> (acedido em 30/01/2017).
- [80] S. Pessanha, A. Guilherme e M. L. Carvalho. “Comparison of matrix effects on portable and stationary XRF spectrometers for cultural heritage samples”. Em: *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 97.2 (2009), pp. 497–505. ISSN: 09478396. DOI: [10.1007/s00339-009-5251-x](https://doi.org/10.1007/s00339-009-5251-x).
- [81] M. Guerra, M. Manso, S. Pessanha, S. Longelin e M. L. Carvalho. “Theoretical and experimental study on the angular dependence of scattering processes in X-ray fluorescence systems”. Em: *X-Ray Spectrometry* 42.5 (2013), pp. 402–407. ISSN: 00498246. DOI: [10.1002/xrs.2491](https://doi.org/10.1002/xrs.2491).
- [82] A. Moreno. “Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques”. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2013, pp. 14–28.
- [83] A. N. Kadachi e M. A. Al-Eshaikh. “Limits of detection in XRF spectroscopy”. Em: *X-Ray Spectrometry* 41.5 (2012), pp. 350–354. ISSN: 00498246. DOI: [10.1002/xrs.2412](https://doi.org/10.1002/xrs.2412).
- [84] B. A.X. S. Microanalysis. *Lab Report XRF 441 Elemental distribution analysis on geological samples with the M4 TORNADO*. Rel. téc.
- [85] R. Rousseau. “Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results”. Em: *The Rigaku Journal* 18.2 (2001), pp. 33–47. URL: <http://www.rigaku.com/downloads/journal/Vol18.2.2001/Rousseau.pdf>.
- [86] R. E. Wolf. “What Is ICP-MS? ... And More Importantly, What Can It Do?” Em: *U.S. Geological Survey, Crustal Geophysics and Geochemistry Science Center* (2005), p. 7. URL: [url:http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html](http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html).
- [87] F. Dunnivant e J. Ginsbach. “Flame Atomic Absorbance and Emission Spectroscopy and Inductively Coupled Spectrometry - Mass Spectrometry”. Em: *Flame Atomic Absorbance and Emission Spectroscopy and Inductively Coupled Spectrometry - Mass Spectrometry* (2009), chapter 1,3,4 e 5.

- [88] L. Lajunen. *Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission*. United Kingdom of great Britain e Ireland: The Royal Society of Chemistry, 1992, pp. 9, 154–199. ISBN: 0-85186-873-8.
- [89] SAIF. ICP-AES- IIT Bombay. URL: <http://www.rsic.iitb.ac.in/icp-aes.html> (acedido em 02/02/2017).
- [90] L. inc. ICP-AES/ICP-OES-Labcompare inc. URL: <http://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/165450-Lab-Tech-Face-Off-ICP-AES-vs-ICP-OES-vs-ICP-MS/> (acedido em 02/02/2017).
- [91] M. Bradford. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. Em: *Analytical biochemistry* 72.1-2 (1976), pp. 248–254.
- [92] D. Guimarães, A. A. Dias, M. Carvalho, M. L. Carvalho, J. P. Santos, F. R. Henriques, F. Curate e S. Pessanha. “Quantitative determinations and imaging in different structures of buried human bones from the XVIII-XIXth centuries by energy dispersive X-ray fluorescence - Postmortem evaluation”. Em: *Talanta* 155 (2016), pp. 107–115. ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.04.028. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.028>.
- [93] D. Guimarães, V. Geraldes, M. Carvalho, I. Rocha e P. Santos. “Metallomics Study of lead accumulation in bones of Wistar rats by X-ray fluorescence analysis : aging effect”. Em: *Royal Society of Chemistry* (2012), pp. 66–71. DOI: 10.1039/c1mt00149c.
- [94] D. National Bureau of Standards. *Bush Branches and Leaves - Trace Elements*.
- [95] J. Cali. *Standard Reference Material 1571- Orchard Leaves*. 1971.
- [96] IAEA-A-13. *Reference Sheet - Trace Elements in Animal Blood*. 2000.
- [97] D. National Bureau of Standards. *Standard Reference Material 1577a*. 1985.
- [98] I. International Atomic Energy Agency. *Main sources contributing to uncertainty in XRF analysis*. (Acedido em 22/07/2017).
- [99] J. Enzweiler e M. A. Vendemiatto. “Estimativa da incerteza de medicao na determinacao de elementos maiores e menores em rochas silicaticas por espectrometria de fluorescencia de raios X com resultados de controle de qualidade”. Em: *Geochimica Brasiliensis* 27(2) (2013), p. 154. DOI: DOI: 10.5327/Z0102-9800201300020007.
- [100] I. Nogueira. “Estudo da Concentração Elementar em Tecidos Biológicos: Trigo e Eucalipto”. Tese de Mestrado. FCT-UNL, universidade nova de Lisboa, 2015.
- [101] FCT-UNL. *Análise Elementar*. URL: <http://www.dq.fct.unl.pt/servicos-externos/analise-elementar> (acedido em 23/07/2017).
- [102] H. Ohkawa, N. Ohishi e K. Yagi. “Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues Thiobarbituric Acid Reaction”. Em: *Analytical Biochemistry* 95 358 (1979), pp. 351–358.

- [103] J. McCord e I. Fridovich. "Catalase Assay". Em: *J.Biol.Chem.* 244.6049-6055 (1969).
- [104] L. Johansson e L. Borg. "A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples". Em: *Analytical Chemistry* 174.1 (1988), pp. 331–336.
- [105] C. Madeira, D. Madeira, M. Diniz, H. Cabra e C. Vinagre. "Comparing biomarker responses during thermal acclimation: A lethal vs non-lethal approach in a tropical reef clownfish". Em: *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 204 (2017), pp. 104–112. DOI: [10.1016/j.cbpa.2016.11.018](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.018).
- [106] R. Lawrence e R. Burk. "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver". Em: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71 (1976), pp. 952–958.
- [107] Sigma Aldrich. *Acetylcholinesterase Activity Assay Kit*. 2013.
- [108] G. Ellman, K. Courtney e V Andres. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Rel. téc. 88-95. 1961.
- [109] R. Magnottl, J. Eberly e D. Quarm. "Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field". Em: *Clinical Chemistry Chem* 33(10) (1987), pp. 1731–1735.
- [110] T. Barcelos. "Cobre: vital ou prejudicial para a saúde humana". Tese de doutoramento. Universidade da Beira Interior, 2008.
- [111] J. J. Winzerling e J. H. Law. "COMPARATIVE NUTRITION". Em: *Annual review nutrition* (1997).
- [112] Q. Yi. *Point sources of Pollution: Local effects and their control-volume II*. OLSS Publications, 2009, p. 36. ISBN: 9781848261686.
- [113] M. Silva. *Princípios gerais da Toxicologia Alimentar : Especialização em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional*. 2009.
- [114] L. Gambling, H. S. Andersen e H. J. Mcardle. "Iron and copper , and their interactions during development". Em: *Biochemical society Transactions* 36 (2008), pp. 1258–1261. DOI: [10.1042/BST0361258](https://doi.org/10.1042/BST0361258).
- [115] A. M. Souza e C. F. F. Tavares. "Chumbo e anemia". Em: *Chumbo e a saúde humana* 42.3 (2009), pp. 337–340.
- [116] M Finley, M Dieter e L Locke. "Lead in tissues of mallard ducks dosed with two types of lead shot". Em: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 16.3 (1976), pp. 261–263.
- [117] J. Chen, Y. Chen, W. Liu, C. Bai, X. Liu, K. Liu, R. Li, J. H. Zhu e C. Huang. "Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish". Em: *Neurotoxicology and Teratology* 34.6 (2012), pp. 581–586. ISSN: 08920362. DOI: [10.1016/j.ntt.2012.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.09.001). URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2012.09.001>.

- [118] M. M. Authman. "Use of fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution". Em: *Journal of Aquaculture Research & Development* 06.04 (2015), pp. 1–13. ISSN: 21559546. DOI: 10.4172/2155-9546.1000328. URL: <http://www.omicsonline.org/open-access/use-of-fish-as-bioindicator-of-the-effects-of-heavy-metals-pollution-2155-9546-1000328.php?aid=47054>.
- [119] M. Saqid. *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*. new york: Marcel Dekker, inc., 1992. ISBN: 0-8247-8647-5.
- [120] M. Anusuya e B. Kiran. "Evaluation of effects of lead, alcohol and vitamin E on lipid peroxidation on brain tissue". Em: *Internation Journal of Life science &Pharma Research* 2.2 (2012), pp. 37–41.
- [121] N. Vaziri, C.-y. Lin, F. Farmand e R. Sindhu. "Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension". Em: *Kidney International* 63 (2003), pp. 186–194. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00711.x.
- [122] H. Zhang, Y. Liu, R. Liu, C. Liu e Y. Chen. "Molecular Mechanism of Lead-Induced Superoxide Dismutase Inactivation in Zebra fish Livers". Em: *The journal of Physical Chemistry B* (2014).
- [123] K. Boudjema, S. Kourdali, N. Bounakous, A. Meknachi e A. Badis. "Catalase Activity in Brown Mussels (*Perna perna*) under Acute Cadmium, Lead and Copper Exposure and Depuration Tests". Em: *Journal of Marine Biology* (2014). DOI: 10.1155/2014/830657. URL: <https://www.hindawi.com/journals/jmb/2014/830657/citations/>.
- [124] M Dimitrova, V Tishinova e V Velcheva. "Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*)". Em: *Comp. Biochem. Physiol.* 108.8 (1994), pp. 43–46.
- [125] D. Nadeau, S. Corneau, I. Plante, G. Morrow, R. M. Tanguay, D. Nadeau, S. Corneau e I. Plante. "Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*". Em: *Cell Stress Society International* 6.2 (2001), pp. 153–163.
- [126] L. Cabell, C. Ferguson, D. Luginbill, M. Kern, A. Weingart e G. Audesirk. "Differential induction of heme oxygenase and other stress proteins in cultured hippocampal astrocytes and neurons by inorganic lead". Em: *Toxicology and Applied Pharmacology* 198.1 (2004), pp. 49–60. ISSN: 0041008X. DOI: 10.1016/j.taap.2004.03.001.
- [127] S. Efremova, M. BA, I. Guzhova e V. Itskovich. "Heat shock protein HSP70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper plant". Em: *Aquatic Toxicology* (2002).

- [128] T. Posser. “Ações do chumbo sobre o sistema nervoso central: aspectos celulares e moleculares”. Tese de doutoramento. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- [129] Y. Wu, X Pan, S. Mudumana e H Wang. “Development of a heat shock inducible gfp transgenic zebrafish line by using the zebrafish hsp27 promoter”. Em: *gene* (2008). DOI: [10.1016/j.gene.2007.10.027](https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.027).
- [130] E Fulladosa, E Deane, A NG e J. Murat. “Stress proteins induced by exposure to sublethal levels of heavy metals in sea bream (*Sparus sarba*) blood cells”. Em: *Toxicology in vitro* (2006). DOI: [0.1016/j.tiv.2005.06.005](https://doi.org/0.1016/j.tiv.2005.06.005).
- [131] C. Singer, S. Zimmermann e B. Sures. “Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum , palladium and rhodium): Comparison with lead and cadmium exposures”. Em: *Aquatic Toxicology* 75 (2005), pp. 65–75. DOI: [10.1016/j.aquatox.2005.07.004](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.07.004).
- [132] F. Labrot, D. Ribera, M. S. Denis e J. F. Narbonne. “In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species”. Em: *Biomarkers* 1.1 (1996), pp. 21–28. ISSN: 1354-750X. DOI: [10.3109/13547509609079343](https://doi.org/10.3109/13547509609079343).
- [133] M. E. Ariza, G. N. Bijur e M. V. Williams. “Lead and Mercury Mutagenesis : Role of H₂O₂ , Superoxide Dismutase , and Xanthine Oxidase”. Em: *Environmental and Molecular Mutagenesis* 361.January (1998), pp. 352–361.
- [134] S. Rajat e K. Gill. “Effect of Lead on Lipid Peroxidation in Liver of Rats”. Em: *Humana Press Inc.* 48.4 (1994).



VALORES ASSOCIADOS ÀS MEDIÇÕES EFECTUADAS AOS PEIXE ZEBRA

Tabela A.1: Medições dos peixes zebra.

peixe	peso (mg) $\pm 0,1$	peso liofilizado (mg) $\pm 0,1$	comprimento (mm) $\pm 0,05$	sexo
Controlo 1	242,2	15,0	25,0	macho
Controlo 2	315,4	24,0	26,0	fêmea
Controlo 3	258,3	25,0	25,0	macho
Controlo 4	258,0	31,0	25,0	fêmea
Controlo 5	519,0	126,0	31,0	macho
Controlo 6	440,0	14,0	29,0	fêmea
10ppm 1	432,0	68,0	27,0	macho
10ppm 2	481,0	87,0	32,0	fêmea
10ppm 3	278,0	35,0	25,0	macho
20ppm 1	580,0	109,0	31,0	macho
20ppm 2	437,0	58,0	30,0	fêmea
20ppm 3	368,0	47,0	29,0	macho
40ppm 1	258,0	29,0	23,0	fêmea
40ppm 2	460,0	48,0	30,0	fêmea
40ppm 3	299,0	44,0	25,0	macho
100ppm 1	357,0	58,0	27,0	fêmea
100ppm 2	409,0	67,0	30,0	macho
100ppm 3	569,0	90,0	34,0	macho

VALORES ASSOCIADOS À TÉCNICA DE μ -EDXRF

Tabela B.1: Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida em função dos tecidos alvos. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

	Brânquias ($\mu\text{g/g}$)	Área visceral ($\mu\text{g/g}$)	Peixe inteiro($\mu\text{g/g}$)
controlo	BDL	BDL	BDL
10 $\mu\text{g/g}$	50 \pm 50	60 \pm 40	30 \pm 20
20 $\mu\text{g/g}$	60 \pm 30 *	30 \pm 40	20 \pm 20
40 $\mu\text{g/g}$	600 \pm 200 *	40 \pm 20	80 \pm 60 *
100 $\mu\text{g/g}$	30 \pm 10 *	200 \pm 200	50 \pm 50

Tabela B.2: Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida em função dos tecidos alvos e do sexo dos *Danio rerio*. Os valores sem desvio padrão são os referentes a um único peixe.

	Brânquias ($\mu\text{g/g}$)	Área visceral ($\mu\text{g/g}$)	Peixe inteiro($\mu\text{g/g}$)
controlo macho	BDL	BDL	BDL
controlo fêmea	BDL	BDL	BDL
10 $\mu\text{g/g}$ macho	50 \pm 50	60 \pm 50	20 \pm 20
10 $\mu\text{g/g}$ fêmea	36	75	39
20 $\mu\text{g/g}$ macho	10 \pm 10	3 \pm 1	7 \pm 1
20 $\mu\text{g/g}$ fêmea	53	72	32
40 $\mu\text{g/g}$ macho	384	19	27
40 $\mu\text{g/g}$ fêmea	19 \pm 1	200 \pm 200	18 \pm 4
100 $\mu\text{g/g}$ macho	30 \pm 10	200 \pm 200	50 \pm 50
100 $\mu\text{g/g}$ fêmea	33	325	126

Tabela B.3: Dados referentes à concentração elementar média de ferro e cobre para os diferentes grupos

	Brânquias ($\mu\text{g/g}$)	Área visceral ($\mu\text{g/g}$)	Peixe inteiro($\mu\text{g/g}$)
10 $\mu\text{g/g}$	330 \pm 20	150 \pm 50	130 \pm 20
20 $\mu\text{g/g}$	270 \pm 20	130 \pm 10	140 \pm 20
40 $\mu\text{g/g}$	218 \pm 20	200 \pm 90	100 \pm 60
100 $\mu\text{g/g}$	240 \pm 30	170 \pm 40	90 \pm 50



VALORES ASSOCIADOS À TÉCNICA DE EDXRF COM GEOMETRIA TRIAXIAL

Tabela C.1: Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida pela técnica de EDXRF com geometria triaxial. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	concentração de Pb ($\mu\text{g/g}$)
controlo	BDL
10 $\mu\text{g/g}$	200 \pm 200 *
20 $\mu\text{g/g}$	100 \pm 100 *
40 $\mu\text{g/g}$	40 \pm 30 *
100 $\mu\text{g/g}$	300 \pm 300 *

Tabela C.2: Dados referentes à concentração elementar de Pb obtida em função do sexo dos *Danio rerio* através da técnica de EDXRF com geometria triaxial. Os valores sem desvio padrão são os referentes a um único peixe.

grupo	concentração de Pb ($\mu\text{g/g}$)
controlo macho	BDL
controlo fêmea	BDL
10 $\mu\text{g/g}$ macho	110 \pm 90
10 $\mu\text{g/g}$ fêmea	427
20 $\mu\text{g/g}$ macho	14 \pm 2
20 $\mu\text{g/g}$ fêmea	282
40 $\mu\text{g/g}$ macho	19
40 $\mu\text{g/g}$ fêmea	50 \pm 20
100 $\mu\text{g/g}$ macho	300 \pm 300
100 $\mu\text{g/g}$ fêmea	250



VALORES ASSOCIADOS À TÉCNICA DE ICP-AES

Tabela D.1: Dados referentes à concentração elementar média de Pb obtida pela técnica ICP-AES. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	concentração de Pb ($\mu\text{g/g}$)
controlo	não detectado
10 $\mu\text{g/g}$	5 \pm 3 *
20 $\mu\text{g/g}$	9 \pm 6 *
40 $\mu\text{g/g}$	40 \pm 20 *
100 $\mu\text{g/g}$	200 \pm 200 *

Tabela D.2: Dados referentes à concentração elementar de Pb obtida em função do sexo dos *Danio rerio* através da técnica ICP-AES. Os valores sem desvio padrão são os referentes a um único peixe.

grupo	concentração de Pb ($\mu\text{g/g}$)
controlo macho	não detectado
controlo fêmea	não detectado
10 $\mu\text{g/g}$ macho	2,6 \pm 0,9
10 $\mu\text{g/g}$ fêmea	9
20 $\mu\text{g/g}$ macho	6 \pm 5
20 $\mu\text{g/g}$ fêmea	15
40 $\mu\text{g/g}$ macho	20
40 $\mu\text{g/g}$ fêmea	53 \pm 3
100 $\mu\text{g/g}$ macho	200 \pm 200
100 $\mu\text{g/g}$ fêmea	178

Tabela D.3: Dados referentes aos materiais de referência *Oyster tissue*. Pesou-se e digeriu-se 100mg de tecido de ostra de forma a certificar a técnica.

SRM($\mu\text{g/g}$)	valor obtido pelo ICP-AES ($\mu\text{g/g}$)
0,322 \pm 0,019	0,308 \pm 0,009

VALORES ASSOCIADOS AO ESTUDO ENZIMÁTICO

Tabela E.1: Dados referentes aos níveis de peroxidação lipídica para os diferentes grupos. Os resultados são apresentados na forma de MDA \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	concentração de MDA (nmol.mg total proteína ⁻¹) \pm desvio padrão
controlo	0,013 \pm 0,004
10 μ g/g	0,02 \pm 0,02
20 μ g/g	0,04 \pm 0,02 *
40 μ g/g	0,054 \pm 0,008 *
100 μ g/g	0,04 \pm 0,02 *

Tabela E.2: Dados referentes à inibição da SOD. para os diferentes grupos. Os resultados apresentam-se em % de inibição de SOD. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	inibição da enzima SOD (%) \pm desvio padrão
controlo	38 \pm 7
10 μ g/g	38 \pm 5
20 μ g/g	44 \pm 4
40 μ g/g	46 \pm 3
100 μ g/g	60 \pm 2 *

Tabela E.3: Dados referentes à actividade da CAT para os diferentes grupos. Os resultados apresentam-se na forma de actividade CAT \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	actividade da CAT (nmol.min.mg proteína total⁻¹) \pm desvio padrão
controlo	50 \pm 10
10 μ g/g	37 \pm 4
20 μ g/g	32 \pm 1 *
40 μ g/g	40 \pm 7
100 μ g/g	40 \pm 20

Tabela E.4: Dados referentes à HSP70 aquando da exposição ao chumbo dos diferentes grupos. Os resultados apresentam-se na forma de quantidade de HSP70 \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	quantidade de HSP70 (μg /mg) \pm desvio padrão
controlo	0,51 \pm 0,05
10 μ g/g	0,3 \pm 0,2
20 μ g/g	0,6 \pm 0,5
40 μ g/g	0,099 \pm 0,006 *
100 μ g/g	0,2 \pm 0,2 *

Tabela E.5: Dados referentes à actividade de GPX para as diferentes grupos de concentração de chumbo. Os resultados apresentam-se na forma de actividade GPX \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	actividade de GPX (nmol.min.mg proteína total⁻¹) \pm desvio padrão
controlo	1,6 \pm 0,8
10 μ g/g	0,8 \pm 0,2
20 μ g/g	1,4 \pm 0,2 *
40 μ g/g	0,7 \pm 0,2 *
100 μ g/g	0,9 \pm 0,2

Tabela E.6: Dados referentes à actividade de AchE para as diferentes grupos de concentração de chumbo. Os resultados apresentam-se na forma de actividade de AchE \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) relativamente ao grupo controlo.

grupo	actividade de AchE (nmol.min.mg proteína total⁻¹) \pm desvio padrão
controlo	6 \pm 2
10 μ g/g	5 \pm 2
20 μ g/g	6,9 \pm 0,9
40 μ g/g	8 \pm 2
100 μ g/g	7,3 \pm 0,7